

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Ecole Doctorale : AGRICULTURE, ALIMENTATION, BIOLOGIE, ENVIRONNEMENT, SANTE

8 Février 2007

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'INA P-G

Spécialité : Biochimie - Immunologie

WANG Xiao-fei

IDENTIFICATION D'EPITOPES T CD4+ D'ANTIGENES TUMORAUX

Laboratoire d'accueil :

Laboratoire de Chimie et d'Immunologie de Protéines

Directeur de thèse : B. MAILLÈRE

Membres du jury :

| | | |
|-------------|-----------|--------------------|
| Jean-Claude | MEUNIER | Président du jury |
| Bernard | MAILLÈRE | Directeur de thèse |
| François | LEMONNIER | Rapporteur |
| Eric | TARTOUR | Rapporteur |
| Hassane | ZAROUB | Examineur |

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier vivement M. le professeur Jean-Claude Meunier de l'INA P-G, qui m'a acceptée dans sa spécialisation pour ma troisième année. Cette formation m'a permis d'avoir appris de nombreuses techniques de base pour la recherche biologique et m'a donné l'envie de faire cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de toutes mes reconnaissances.

Je suis très reconnaissante à M François Lemonnier, M Eric Tartour, et M Hassane Zarour de me faire l'honneur de participer au jury et de juger ce travail.

Je tiens particulièrement à adresser mes plus chaleureux remerciements au Dr Bernard Maillère, directeur de cette thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'acceptant dans son laboratoire il y a quatre ans. Grâce à lui, j'ai pu découvrir le monde d'immunologie. Je le remercie de m'avoir tout d'abord encadrée et formée puis soutenue et conseillée. En particulier, je le remercie pour la correction de cette thèse, un travail très lourd.

J'exprime particulièrement mes reconnaissances à William Cohen qui m'a montré son haut niveau scientifique dans le domaine d'immunologie. Je le remercie particulièrement pour m'avoir apporté toutes ses connaissances et son expérience en culture cellulaire.

Je voudrais adresser plus particulièrement mes remerciements et l'assurance de toute mon amitié à :

Gaetan Munier qui m'a montré tous ses compétences et tous ses patiences et gentillesse, ainsi que tous les soutiens moraux.

Sandra Moratille qui était toujours gentille avec moi. J'admire toujours son efficacité et sa rapidité technique. Je la remercie pour m'avoir initié la culture cellulaire et apporté tous les conseils techniques.

Christine Almunia qui a toujours fait preuve d'une grande patience et d'une gentillesse à mon égard. J'ai beaucoup appris à ses côtés, autant du point de vue professionnel que relationnel.

Stéphanie Raffestin, mon prof de biologie moléculaire. Grâce à elle, j'ai pu apprendre la production de protéines recombinantes et réaliser une partie de manipulations de mes travaux dans son labo. J'ai pu découvrir son haut niveau scientifique et sa fine qualité de travail.

Sylvain Pichard qui m'a montré toutes les techniques de la purification de protéines. Ses compétences en biologie moléculaire m'ont toujours bien impressionnée.

Hélène Nuyteen avec qui j'ai travaillé et de qui je garde un très bon souvenir. Son travail a largement participé à la réalisation de mon projet de thèse.

J'adresse aussi tous mes remerciements à Pascal Belin et Marie Courcon qui m'ont transmis leurs connaissances en biologie moléculaire avec enthousiasme.

Je tien remercie aussi à toutes les autres personnes du sous-sol, présentes durant cette période, qui ont participé par leur humeur à maintenir une excellente ambiance : Florence Castelli, Jérôme Kerzerho, Philémon Servent, Diane Houitte, Anne Chassaing, Emilie Gobbo, Marie Galloux, Julien Barbier, Daniel Gillet, Manuela Lotierzo, Françoise Rousselle, Emmanuel Favry, Bertrand Cezarny, Christian, Marie-thé. Sans oublier ceux qui sont partis : Aurélie barbon, Aurélie Perier, Carole, Léïla, Alexandre, Adrien, etc.

Et enfin j'adresse mes meilleurs sentiments à toutes les personnes du DIEP, qui ont directement ou indirectement permis que ce travail se déroule dans les meilleures conditions.

J'en oublie certainement encore et je m'en excuse.

Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduite à ce jour mémorable.

Résumé

L'induction d'une immunité efficace contre les tumeurs nécessite de recruter des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires et spécifiques. De ce fait, les peptides de tumeurs présentés par les molécules HLA II sont de potentiels candidats pour l'immunothérapie anticancéreuse. Le but de ce travail a été l'identification de nouveaux épitopes T CD4⁺ dérivés de trois antigènes différents : Trag-3 (*Taxol Resistant Associated Gene*) (un travail effectué en collaboration), un antigène spécifique des tumeurs ; la Survivine, un antigène surexprimé ; et l'ensemble de la famille MAGE-A, une famille d'antigènes spécifiques des tumeurs. Toutefois, l'utilisation d'épitopes peptidiques dans la vaccination nécessite de tenir compte du polymorphisme des molécules HLA afin de couvrir le maximum d'individus. Dans cette optique, nous avons appliqué deux stratégies différentes d'identification de peptides, à savoir : 1) identifier des peptides présentés par plusieurs molécules de HLA II (ces peptides sont appelés épitopes promiscuous). Cette stratégie a été appliquée à l'antigène Trag-3 et à la Survivine ; 2) identifier des peptides présentés par les molécules les plus représentées dans la population : les molécules HLA-DP4. Cette stratégie a été appliquée à la famille d'antigènes MAGE-A. Pour chercher les épitopes promiscuous, des peptides chevauchants couvrant l'intégralité de la séquence de Trag-3 et de la Survivine ont tous été synthétisés et testés pour leur capacité de liaison vis-à-vis de 12 molécules HLA-II (DR et DP). L'immunogénicité de peptides pouvant se lier avec plusieurs molécules de HLA II a été évaluée par la génération de lymphocytes T CD4⁺. Finalement, un peptide de Trag-3 (P34-48) et 4 peptides de la Survivine ont été mis en évidence. De plus, des réponses spontanées vis-à-vis du peptide Trag-3 34-48 ont été détectées dans les patients atteints de cancers. Pour chercher les épitopes restreints au HLA-DP4, nous avons d'abord établi un programme de prédiction de ligands potentiels de HLA-DP4. 9 gènes de la famille de MAGE-A ont été analysés et 12 peptides prédits ont été finalement synthétisés et testés dans les tests de liaison de HLA-DP4. 7 peptides ayant une meilleure activité avec les molécules de HLA-DP4 ont été sélectionnés pour évaluer leur immunogénicité *in vitro*. Finalement, 2 peptides de MAGE-A1 et un peptide de MAGE-A12 ont été mis en évidence qu'ils contiennent des épitopes naturellement présentés et apprêtés dans la présentation de l'antigène natif. En conclusion, tous les peptides identifiés dans ce travail présentent tous un intérêt pour la conception des vaccins peptidiques. Nous avons aussi proposé une méthode de prédiction de liaison de HLA-DP4 qui facilite significativement la sélection des peptides.

Mots Clés : épitope T CD4⁺, Trag-3, Survivine, MAGE-A, HLA-II, HLA-DP4, vaccin peptidique

Abstract

The induction of an effective immunity against tumours requires to recruit auxiliary and specific CD4⁺ T lymphocytes. Thus, the peptides of tumours presented by HLA II molecules are potential candidates for the anti-cancer immunotherapy. This work aims at identifying new CD4⁺ T epitopes derived from three different antigens : Trag-3 (Taxol Resistant Associated Gene) (collaboration work) a tumour-specific antigen ; Survivin, an overexpressing antigen ; and the whole MAGE-A family, a collection of tumour-specific antigen. Yet, the use of peptide epitopes in vaccination requires to consider the polymorphism of HLA molecules in order to cover the maximum of individuals. As a result, we applied two different strategies of peptide identification, i.e. : 1) to identify the peptides presented by multiple molecules of HLA II (these peptides are called promiscuous epitopes). This strategy was applied to Trag-3 and Survivin ; 2) to identify the peptides presented by the molecules the most represented in the population : the HLA-DP4 molecules. This strategy was applied to the MAGE-A family. To seek the promiscuous epitopes, overlapping peptides covering the entire sequence of Trag-3 and Survivin were all synthesized and tested for their binding capacity with 12 molecules HLA-II (DR and DP). Immunogenicity of the peptides capable of binding to several molecules of HLA II was evaluated by the induction of CD4⁺ T lymphocytes. Finally a peptide of Trag-3 (P34-48) and 4 peptides of Survivin were revealed. Furthermore, spontaneous responses with respect to peptide Trag-3 34-48 were detected in the patients of cancers. To seek the epitopes restricted to the HLA-DP4, we established firstly a program to predict the potential HLA-DP4 binders. 9 genes of the MAGE-A family were subjected to the prediction. 12 predicted peptides were finally synthesized and tested in the binding test of HLA-DP4. 7 peptides having the best activity with the HLA-DP4 molecules were selected to evaluate their immunogenicity *in vitro*. Finally, 2 peptides of MAGE-A1 and a peptide of MAGE-A12 were revealed that they contain the epitopes naturally processed and presented in the native-antigen presentation. In conclusion, all peptides identified in this work present an interest for the design of peptide vaccines. We also proposed a prediction method for HLA-DP4 which significantly facilitates the selection among a large number of peptides.

Keywords : T CD4⁺ epitope, Trag-3, Survivin, MAGE-A, HLA-II, HLA-DP4, peptide vaccine

Table des matières

| | |
|--|--------------|
| Remerciements | iii |
| Résumé | v |
| Liste des tableaux | iv |
| Table des figures | v |
| Liste des symboles | vi |
| I Contextes Scientifiques | 1 |
| 0 Introduction générale | 3 |
| 1 Le système HLA II et la présentation de l'antigène | 6 |
| 1.1 Généralité | 6 |
| 1.2 La région HLA de classe II | 7 |
| 1.2.1 Structure générale du complexe HLA | 7 |
| 1.2.2 Le polymorphisme allélique et haplotypique dans la région HLA II | 10 |
| 1.2.3 Distribution et régulation de l'expression des molécules HLA II | 15 |
| 1.3 Interaction peptide-molécule HLA II | 17 |
| 1.3.1 Structure des molécules HLA II | 17 |
| 1.3.2 Structure du complexe CMH-peptide | 18 |
| 1.3.3 Le polymorphisme de HLA II contrôle les motifs de liaison . . | 22 |
| 1.4 La présentation de l'antigène | 25 |
| 1.4.1 Dégradation des protéines en fragments peptidiques | 28 |
| 1.4.2 Transport des molécules de classe II et fonction de la chaîne invariante | 29 |
| 1.4.3 Compartiments cellulaires impliqués dans l'association des molécules de classe II au peptide antigénique | 31 |
| 1.4.4 Les cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène restreinte par les molécules de classe II | 32 |
| 1.5 Les molécules HLA-DP | 37 |
| 1.5.1 Organisation de la région génomique HLA-DP | 38 |
| 1.5.2 Structure, polymorphisme, et fréquences géniques de HLA-DP | 38 |
| 1.5.3 Liaison des peptides aux molécules HLA-DP | 42 |
| 1.5.4 Fonction de HLA-DP | 44 |
| 1.5.5 Maladies associées aux molécules HLA-DP | 49 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 1.5.6 | L'intérêt des molécules HLA-DP4 pour la vaccination peptidique | 51 |
| 2 | Immunité antitumorale | 53 |
| 2.1 | Immunité innée antitumorale | 54 |
| 2.1.1 | Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK . . . | 55 |
| 2.1.2 | Les cellules NKT se présentent comme des effecteurs anti-tumoraux | 57 |
| 2.2 | Immunité adaptative antitumorale | 58 |
| 2.2.1 | L'interaction TCR/HLA-peptide | 59 |
| 2.2.2 | Molécules de co-stimulation | 60 |
| 2.2.3 | La synapse immunologique | 61 |
| 2.2.4 | Les lymphocytes T CD8+ et leurs mécanismes de cytotoxicité | 63 |
| 2.2.5 | La présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8+ | 67 |
| 2.2.6 | Fonction des lymphocytes T CD4+ dans l'immunité anti-tumorale | 68 |
| 2.2.7 | La présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD4+ | 71 |
| 2.2.8 | Expression des molécules HLA II par les tumeur | 73 |
| 2.3 | Les antigènes tumoraux | 75 |
| 2.3.1 | Les stratégies d'identification des antigènes tumoraux | 75 |
| 2.3.2 | Classification des antigènes tumoraux | 78 |
| 2.3.3 | Échappement des tumeurs aux réactions immunes | 83 |
| 3 | Vaccination antitumorale | 86 |
| 3.1 | Vaccins à base de peptides | 86 |
| 3.1.1 | Identification de peptides appropriés | 87 |
| 3.1.2 | Les essais cliniques de vaccins peptidiques | 90 |
| 3.1.3 | Amélioration de l'immunogénicité d'épitopes | 93 |
| 3.2 | Vaccins à base de protéines | 97 |
| 3.3 | Vaccins à base de vecteurs viraux | 98 |
| 3.4 | Vaccins à base d'ADN nu | 99 |
| 3.5 | Vaccins à base de cellules | 100 |
| 3.5.1 | Vaccins utilisant des cellules tumorales entières | 100 |
| 3.5.2 | Les vaccins utilisant des cellules tumorales génétiquement mo- difiées | 100 |
| 3.5.3 | Vaccins à base des DCs | 101 |
| 3.6 | Vaccins basés sur d'autres stratégies | 105 |
| 3.6.1 | Vaccins utilisant des protéines HSP | 105 |
| 3.6.2 | La stratégie <i>prime-boost</i> | 105 |
| II | Résultats | 107 |
| 4 | Identification d'épitopes T CD4+ dans Trag-3 | 109 |
| 4.1 | Objectif de travail | 110 |
| 4.2 | Présentation de l'article | 111 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5 | Survivine : une cible pour les nouvelles thérapies anti-cancéreuses | 114 |
| 5.1 | Notions générales relatives à la Survivine | 114 |
| 5.2 | Rôle de la Survivine dans la division cellulaire | 116 |
| 5.3 | Rôle de la Survivine dans l'apoptose | 116 |
| 5.4 | Expression de la Survivine et résistance aux agents anticancéreux . . | 117 |
| 5.5 | Signification pronostique et diagnostique de la Survivine | 118 |
| 5.6 | Intérêt thérapeutique de la Survivine | 119 |
| 5.7 | Intérêt de la Survivine pour l'immunothérapie anti-cancéreuse | 120 |
| 5.8 | Notre objectif | 122 |
| 5.9 | Résultats | 123 |
| 5.9.1 | Tests de liaison des peptides de la Survivine aux molécules du HLA II (DP, DR) | 123 |
| 5.9.2 | Génération de lignées de lymphocytes T CD4+ contre les pep- tides de la Survivine | 125 |
| 5.9.3 | Caractérisations de lignées de lymphocytes T CD4+ induites par les peptides | 126 |
| 5.9.4 | Discussion | 130 |
| 6 | Prédiction d'épitopes T CD4+ restreints au HLA-DP4 | 136 |
| 6.1 | Approches algorithmique utilisées dans la prédiction d'épitopes T CD4+ | 136 |
| 6.2 | Présentation de l'article | 138 |
| 7 | Identification Sélective d'épitopes T CD4+ restreints aux molécules HLA-DP4 dans les antigènes tumoraux MAGE-A | 142 |
| 7.1 | Les antigènes MAGE-A | 142 |
| 7.1.1 | Nature des gènes et expression | 142 |
| 7.1.2 | Immunothérapie anticancéreuse basée sur MAGE-A | 143 |
| 7.1.3 | Détection des antigènes MAGE-A et surveillance de la maladie | 147 |
| 7.2 | Présentation de l'article | 147 |
| 8 | Discussions générales et conclusions | 151 |
| 8.1 | L'efficacité de nos stratégies de recherche des épitopes T | 151 |
| 8.2 | L'importance du répertoire en lymphocytes T dans la réponse contre les peptides | 153 |
| 8.3 | Immunodominance et immunoprévalence des épitopes T CD4+ | 154 |
| 8.4 | Le choix de la molécule HLA II dans la stratégie de sélection des peptides | 155 |
| 8.5 | Utilisation des épitopes T dans les essais cliniques | 157 |
| 8.6 | Conclusions | 159 |
| | Annexe | 163 |
| | Bibliographie | 163 |

Liste des tableaux

| | | |
|-----|---|-----|
| 1.1 | Correspondance entre les spécificités DR définies sérologiquement et les allèles HLA-DRB | 13 |
| 1.2 | Fréquences géniques (en %) de différents allèles HLA-DRB1 | 15 |
| 1.3 | Liste des structures tridimensionnelles de molécules HLA II répertoriées dans la PDB | 19 |
| 1.4 | Résidus présents aux différentes positions polymorphes du sillon de liaison des peptides des molécules HLA-DR utilisées dans ce travail . | 23 |
| 1.5 | Motifs de liaison proposés pour quelques molécules HLA-DR | 26 |
| 1.6 | Résidus polymorphes des chaînes α et β des molécules HLA-DP . . . | 41 |
| 1.7 | Fréquences géniques (en %) de différents allèles HLA-DPB1 | 43 |
| 1.8 | motif de liaison des molécules HLA-DP2, DP4 et DP9 décrits | 45 |
| 2.1 | Antigènes tumoraux humains | 79 |
| 3.1 | méthodes immunologiques de suivi clinique | 92 |
| 3.2 | Vaccinations peptidiques : essais de phase I/II | 94 |
| 3.3 | Résultats de vaccinations à base de DCs dans les patients avec maladies métastatiques | 104 |
| 5.1 | Les épitopes T CD8+ de la Survivine | 121 |
| 5.2 | Capacité de liaison des peptides de la Survivine aux molécules HLA-DR et HLA-DP | 124 |
| 5.3 | Nombre de lignées spécifiques de peptides de la Survivine par individu | 126 |
| 7.1 | Les types de tumeurs exprimant les gènes de MAGE-A | 144 |
| 7.2 | Les peptides antigéniques principaux utilisés pour vacciner les patients de mélanome | 145 |

Table des figures

| | | |
|------|--|-----|
| 1.1 | Schéma simplifié de l'organisation génétique des complexes majeurs d'histocompatibilité humain (A) et murin (B). | 8 |
| 1.2 | Organisation de la région HLA de classe II. | 9 |
| 1.3 | Principe de nomenclature des allèles HLA-DRB. | 12 |
| 1.4 | Représentation schématique des cinq haplotypes DR. | 14 |
| 1.5 | Schéma général des molécules de CMH I et de CMH II. | 18 |
| 1.6 | Structure de la molécule HLA de classe II. | 20 |
| 1.7 | Complexe peptide - molécule de CMH II. | 21 |
| 1.8 | Réseau de liaisons hydrogène entre le squelette du peptide et la molécule de CMH II. | 21 |
| 1.9 | Les voies de présentation de l'antigène. | 27 |
| 1.10 | Organisation des gènes DP du locus HLA-D. | 38 |
| 1.11 | Comparaison de la variabilité de séquence dans les domaines $\alpha 1/\beta 1$ des molécules HLA II. | 40 |
| 1.12 | Poches de spécificité de HLA-DR1/HA (A) et Complexes de HLA-DP4/ d'Oxy (B). | 42 |
| 2.1 | Vue générale de la synapse immunologique mature. D'après [Huppa and Davis, 2003] | 62 |
| 2.2 | La perforine et les granzymes sont libérés au niveau de la synapse immunologique. D'après [Lieberman, 2003] | 64 |
| 2.3 | Induction de l'apoptose par FasL. D'après [Barry and Bleackley, 2002] | 66 |
| 2.4 | Rôle des cellules T CD4+ dans la modulation des réponses immunes anti-tumorales. D'après [Wang, 2001] | 72 |
| 5.1 | Survivine et ses variantes épissés, Survivine-2 β , Survivine- Δ Ex-3, Survivine-3 β | 115 |
| 5.2 | Mécanismes potentiels par lesquels la Survivine inhibe l'apoptose. | 117 |
| 5.3 | Tests de restriction | 128 |
| 5.4 | Tests de dose réponse | 129 |
| 5.5 | Reconnaissance de l'antigène natif | 131 |

Liste des symboles

| | | | |
|-----------------------------------|---|-----------------------------|---|
| α-GalCer | α -Glactosylceramide | ADCC | <i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> |
| APCs | Cellules Présentatrices d'Antigène | β2m | β 2 microglobuline |
| BCG | Bacille de Calmette et Guérin | CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| CMH | Complex Majeur d'Histocompatibilité | CLIP | <i>Class II Associated Invariant Chain Peptides</i> |
| CTLA-4 | Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 | CTLs | Lymphocytes T Cytotoxiques |
| DCs | Cellules Dendritiques | EBV | Virus d'Epstein-Barr |
| GM-CSF | <i>Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> | GVH | <i>Graft-Versus-Host</i> |
| HLA | <i>Human Leucocyte Antigene</i> | HIV | <i>Human Immunodeficiency Virus</i> |
| HPV | <i>Human Papillomavirus</i> | HSP | <i>Heat Shock Protein</i> |
| HSV | <i>Herpes Simplex Virus</i> | IAP | <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i> |
| Ig | Immunoglobuline | IL | Interleukine |
| IFN-γ | Interféron- γ | KAR | <i>Killing Activating Receptor</i> |
| KIRs | <i>Killer Cell Inhibitory Receptors</i> | NK | <i>Natural Killer</i> |
| PBL | <i>Peripheral Blood Lymphocytes</i> | PBMC | <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> | PSMA | <i>Prostate-Specific Membrane Antigen</i> |
| RAG | <i>Recombinaison Activating Genes</i> | RE | Réticulum Endoplasmique |
| SEREX | <i>Serological Expression Cloning of Human Tumor Antigens</i> | STAT | <i>Signal Transducer and Activator</i> |
| TAP | <i>Transporter Activated Peptide</i> | TCM | <i>Central Memory T Cells</i> |
| TCR | T Cell Recepteur | TEM | <i>Effector Memory T Cells</i> |
| TGF-β | <i>Transforming Growth Factor-β</i> | Th | <i>T help</i> |
| TIL | Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs | TNF | <i>Tumor Necrosis Factor</i> |
| TNFR-1 | Récepteur du TNF de Type 1 | Trag-3 | <i>Taxol Resistant Associated Gene</i> |
| TRAIL | <i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i> | TRAIL-R | TRAIL Receptor |

Première partie

Contextes Scientifiques

Chapitre 0

Introduction générale

Le système immunitaire a pour fonction le maintien de l'intégrité du soi. Bien que son rôle majeur soit l'élimination des agents infectieux, son implication dans le contrôle du développement du cancer a été longtemps controversée mais est maintenant clairement établie [Rosenberg, 2001]. L'idée d'utiliser le système immunitaire pour lutter contre le cancer n'est pas nouvelle. Dès la fin du 19ème siècle, des expériences d'inoculation d'extraits bactériens furent réalisées afin de stimuler une réponse immunitaire antitumorale [Coley, 1991]. La première observation qu'une manipulation du système immunitaire peut conduire à la régression de cancers fut faite lors d'expériences d'administration d'IL-2 à des patients atteints du cancer du rein et du mélanome [Rosenberg et al., 1985b, Rosenberg et al., 1985a].

De nombreuses études dans des modèles expérimentaux animaux ont montré que l'immunité à médiation cellulaire, plutôt que l'immunité humorale, est responsable du rejet de tumeurs ou de tissus allogéniques transplantés. Cette réponse protectrice fait intervenir les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+ ou CTL) et auxiliaires (CD4+) qui reconnaissent spécifiquement par l'intermédiaire de leur récepteur T des peptides antigéniques associés aux molécules HLA et présentés à la surface des APCs.

L'identification d'un nombre croissant d'antigènes tumoraux, reconnus par les lymphocytes T, a permis d'envisager de nouvelles perspectives dans le domaine de l'immunothérapie antitumorale [Boon et al., 1997]. Les peptides antigéniques tumoraux, (les épitopes T) jouent un rôle déterminant dans la spécificité de la réponse immunitaire. L'immunothérapie utilisant les antigènes peptidiques d'origine tumorale comme agents thérapeutiques permet d'activer le système immunitaire de façon beaucoup

plus spécifique que l'injection d'IL-2 par exemple, et dirige la réaction immunitaire spécifiquement contre les cellules tumorales.

Mon objectif de thèse a été l'identification de nouveaux épitopes T CD4+ dérivés de trois antigènes : Trag-3 [Duan et al., 1999](un travail effectué en collaboration) un antigène spécifique des tumeurs (aussi appelé cancer testis); Survivin [Ambrosini et al., 1997] un antigène surexprimé; et l'ensemble de la famille MAGE-A [Knuth et al., 1989] qui est une famille d'antigènes spécifiques des tumeurs.

L'utilisation d'épitopes peptidiques dans la vaccination nécessite de tenir compte du polymorphisme des molécules HLA afin de couvrir le maximum d'individus. Dans cette optique, nous avons appliqué deux stratégies différentes d'identification de peptides, à savoir : 1) identifier des peptides présentés par plusieurs molécules HLA II (ces peptides sont appelés épitopes promiscuitaire). Cette stratégie a été appliquée à l'antigène Trag-3 et à la Survivine ; 2) identifier des peptides présentés par la molécule la plus représentée dans la population : la molécule HLA-DP4. Cette stratégie a été appliquée à la famille d'antigènes MAGE-A.

Ce travail a donné lieu aux brevets et publications suivants :

Brevets

1. X.-F. Wang, G. Munier, S. Pouvelle-Moratille, H. Nuyttens, and B. Maillere. (30 septembre 2005). Epitopes T CD4+ de la protéine survivine et leurs applications. Demande N° : 0510013
2. X.-F. Wang, G. Munier, S. Pouvelle-Moratille, H. Nuyttens, and B. Maillere. (1er septembre 2005). Epitopes T CD4+ des antigènes MAGE-A restreints à HLA-DP4 et leurs applications. Demande N° : 0508968

Publications

1. W. M. Cohen, S. Pouvelle-Moratille, X.-F. Wang, S. Farci, G. Munier, D. Charon, A. Ménez, M. Busson, and B. Maillère. Scanning the HIV genome for CD4+ T cell epitopes restricted to HLA-DP4, the most prevalent HLA Class II molecule. *J. Immunol*, 2006, 176 : 5401-5408.
2. B. Janjic, P. Andrade, X.-F. Wang, J. Fourcade, C. Almunia, P. Kudela, A. Brufsky, S. Jacobs, D. Friedland, R. Stoller, D. Gillet, R. B. Herberman, J. M.

- Kirkwood, B. Maillere and H. M. Zarour. Spontaneous CD4+ T Cell Responses Against Trac-3 in Patients with Melanoma and Breast Cancers. *J. Immunol.* 2006, 177 : 2717-2727
3. Wang, X. F., W. M. Cohen, F. A. Castelli, C. Almunia, B. Lethe, S. Pouvelle-Moratille, G. Munier, D. Charron, A. Menez, H. M. Zarour, P. van der Bruggen, M. Busson, and B. Maillere. 2006. Selective identification of HLA-DP4 binding T cell epitopes encoded by the MAGE-A gene family. *Cancer Immunol Immunother.*
 4. M. Busson, F. A. Castelli, X.-F. Wang, W. M. Cohen, D. Charron, and B. Maillère. Prediction of CD4+ T Cell epitopes restricted to HLA-DP4 molecules. *Journal of Immunol. Methods*, 2006, 317 : 144-151

Chapitre 1

Le système HLA II et la présentation de l'antigène

1.1 Généralité

Historiquement, le CMH fut identifié comme un des principaux facteurs responsables des rejets de greffe. Sa découverte fut saluée par le Prix Nobel de Médecine 1980 décerné à Dausset, Snell et Benacerraf. Cet ensemble de gènes étroitement liés intervient en effet dans le rejet rapide et violent des greffons par le système immunitaire. Cette propriété est à l'origine de la dénomination de « CMH ». Ainsi, les termes « complexe » et « majeur » évoquent, d'une part, le nombre important de gènes impliqués dans la réaction, et d'autre part, la violence et la rapidité du rejet. Enfin, le terme « histocompatibilité » souligne le fait que c'est la reconnaissance des produits du CMH par les cellules immunitaires qui détermine la compatibilité ou l'incompatibilité entre tissus. Chez l'homme et la souris, le CMH prend respectivement le nom de HLA et H-2 (Histocompatibility 2). Cependant, la fonction naturelle du CMH n'est pas de rejeter les greffons placés artificiellement dans l'organisme au cours des transplantations. En effet, sa fonction biologique est la présentation de fragments d'antigènes, sous forme de peptides, aux lymphocytes T (phénomène de restriction). Cette fonction ne commence à être entrevue qu'au début des années 1970 (Zinkernagel et Doherty, 1974; Prix Nobel de médecine 1996) et admise au milieu des années 1980.

La définition stricte du CMH est génétique. Il est défini comme la région chromo-

somique où se situent les gènes contrôlant la structure et l'expression des molécules présentatrices de l'antigène. Cependant, l'usage défini plutôt le CMH de façon fonctionnelle comme l'ensemble des molécules impliquées dans la présentation de peptides aux lymphocytes T. Ces molécules peuvent soit présenter directement l'antigène soit simplement contribuer à la fonction de présentation de l'antigène. Ces deux définitions sont cependant à nuancer. En effet, certaines molécules participant à la présentation de l'antigène ($\beta 2m$, chaîne invariante) sont codées en dehors du CMH alors que certains produits du CMH comme le TNF ne semblent avoir aucune relation avec la fonction de présentation.

Les gènes du CMH et leurs produits sont répartis en trois classes (I, II et III) selon leurs propriétés biochimiques, leur expression phénotypique et leur fonction. Seuls les produits de classe I et II sont impliqués dans la fonction de présentation de l'antigène aux lymphocytes T et constituent pour le système immunitaire un moyen de surveillance des milieux intracellulaire et extracellulaire. En effet, les protéines cytoplasmiques sont présentées aux cellules T CD8+ sous la forme de peptides courts (8 à 10 résidus) associés aux molécules de CMH I. Au contraire, les molécules de CMH II présentent aux lymphocytes T CD4+ des peptides longs (12 à 25 résidus) issus de la dégradation endosomale de protéines extracellulaires [Rammensee et al., 1993, Madden, 1995]. Enfin la région de classe III comporte des gènes non apparentés au HLA. Certains sont des gènes du complément (C2, C4 et le facteur B), de la 21-hydrolase (métabolisme des corticoïdes surrénaliens), et des cytokines (facteurs nécrosant des tumeurs, TNF)... Ils ne seront pas évoqués par la suite car ils ne sont pas impliqués dans la présentation de l'antigène.

Comme mon travail a porté sur l'identification de peptides antigéniques présentés par les molécules HLA de classe II, nous nous intéresserons donc principalement dans cette partie à cette voie de présentation.

1.2 La région HLA de classe II

1.2.1 Structure générale du complexe HLA

Le complexe HLA a été localisé avec précision au début des années 1980, par hybridation in situ de sondes génomiques HLA de classe I et II, sur la bande 21-

3 du bras court du chromosome 6 [Morton et al., 1984]. La carte d'ensemble du complexe HLA de l'homme, représentée schématiquement Fig. 1.1 1A, est établie à la fin des années 1980 grâce à la technique d'électrophorèse en champ pulsé. Le complexe s'étend sur environ 3600 kb. 86 gènes y sont répertoriés [Trowsdale et al., 1991]. Ils sont répartis en trois régions, régions de classe II, III et I, du centromère vers le télomère. Cependant, seule une minorité de ces gènes correspond à des gènes ou pseudogènes de classe I (13 gènes) ou de classe II (23 gènes).

La région de classe I contient environ une vingtaine de gènes dont trois uniquement (HLA-A, -B et -C) sont ubiquitairement exprimés. Les gènes HLA-E, -F, -G et -H sont potentiellement exprimables, le produit de HLA-G a été identifié à la surface de cytotrophoblastes. Maintenant, la molécule HLA-E est connue comme le ligand primaire pour le récepteur inhibiteur humain CD94/NKG2A de cellules NK. L'expression de surface de HLA-E est stabilisée par son association avec les peptides nonamères dérivés des séquences de signal d'autres molécules de HLA I.

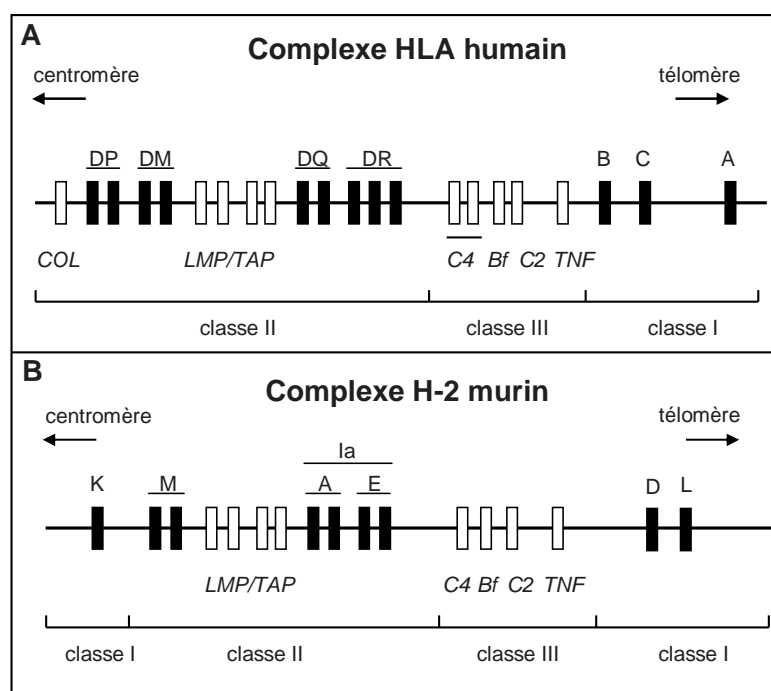


FIG. 1.1: Schéma simplifié de l'organisation génétique des complexes majeurs d'histocompatibilité humain (A) et murin (B).

Les gènes représentés par des rectangles noirs correspondent aux gènes exprimés. Ceux schématisés par des rectangles blancs sont des pseudogènes défectifs associés à la région CMH. Les gènes ne sont pas représentés à l'échelle.

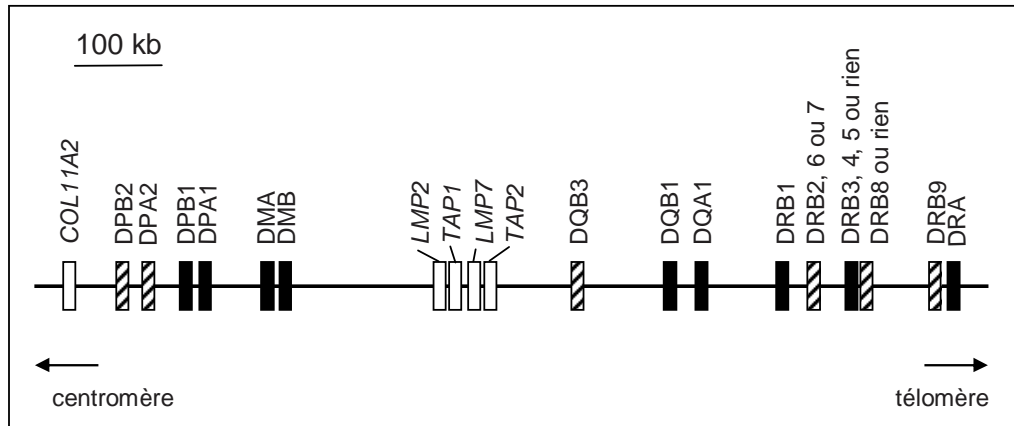


FIG. 1.2: Organisation de la région HLA de classe II.

Les gènes ne sont pas représentés à l'échelle, seules les distances les séparant le sont. En noir, sont représentés les gènes HLA II exprimés, en hachuré les pseudogènes HLA II et en blanc les gènes associés à la région HLA II effectivement exprimés (COL11A2 : collagène, LMP : protéasome).

La région de classe II contient 23 à 25 gènes et pseudogènes. Elle comprend 6 à 7 locus fonctionnels (Fig. 1.2) : deux ou trois codant les molécules HLA-DR (DRA et un ou deux DRB), deux codant les molécules HLA-DQ (DQA et DQB) et deux codant les molécules HLA-DP (DPA et DPB). Les gènes A et B correspondent respectivement à chacune des deux chaînes α et β des molécules HLA II. Il existe plusieurs gènes DRB : DRB1 code une chaîne β qui est toujours exprimée, et les gènes DRB3, DRB4 et DRB5 (mutuellement exclusifs) codent pour une deuxième molécule qui n'est pas nécessairement présente. De plus, trois pseudogènes DRB (DRB2, DRB6 à DRB9) ont également été décrits. Cette région contient également les deux gènes DMA et DMB qui codent la molécule HLA-DM (molécule impliquée dans la présentation de l'antigène), six gènes peu ou pas transcrits et onze gènes non-apparentés aux gènes de classe II dont certains sont identifiés. Il s'agit des gènes codant pour le collagène (gène COL11A2), les deux chaînes du transporteur de peptides TAP (TAP1 et TAP2) et deux unités du protéasome (LMP2 et LMP7). Bien que codé dans le CMH II, l'ensemble protéasome-transporteur constitue un élément majeur de la machinerie alimentant en peptides les molécules CMH I néosynthétisées [Germain, 1994].

Enfin, la région de classe III comporte des gènes non-apparentés au CMH, comme des gènes du complément (C2, Bf, C4A et C4B), de la 21-hydroxylase (enzyme intervenant dans le métabolisme des corticoïdes surrénaliens), des facteurs nécrosant des

tumeurs (TNF) et des protéines HSP.

Cette organisation du locus CMH est très conservée dans toutes les espèces étudiées. Elle est en particulier retrouvée chez la souris qui est un organisme modèle pour l'étude fonctionnelle du CMH. Le complexe CMH murin ou H-2 possède une structure comparable à celui de l'homme (Fig. 1.1). Il est porté par le chromosome 17 et s'étend sur 2500 kb. Les gènes de classe I sont nommés K, D, et L, et ceux de classe II I-E et I-A.

1.2.2 Le polymorphisme allélique et haplotypique dans la région HLA II

Le complexe HLA de classe II (tout comme celui de classe I) se caractérise par un important polymorphisme et une variabilité structurale de ses gènes. A cause de leurs implications dans la transplantation d'organes, ces propriétés ont été décrites très en détail. La variabilité correspond au degré de différence entre deux gènes (ou molécules). Elle est mesurée par le pourcentage de nucléotides (ou acides aminés) différents entre les objets considérés. Le polymorphisme se définit, quant à lui, au niveau d'une population. Un locus est polymorphe lorsqu'il présente au moins deux gènes allèles dans la population avec une fréquence d'au moins 0,01. Bien qu'elle soit le support du polymorphisme, la variabilité ne le définit pas.

1.2.2.1 Caractérisation du polymorphisme

La description du polymorphisme de la région HLA de classe II est le résultat de l'application successive de diverses techniques, principalement la culture mixte lymphocytaire (MLC aussi connu sous le terme de MLR pour mixed lymphocytic reaction), la sérologie et enfin la biologie moléculaire [Colombani, 1993].

La MLC est une technique employée pour vérifier la compatibilité entre un donneur et un receveur (ou pour identifier le type CMH). Elle mesure la prolifération lymphocytaire observée lorsque des cellules allogéniques sont mélangées dans une culture à court terme (6 jours). On met en présence un nombre défini de leucocytes provenant du donneur (ou de cellules de référence) avec un nombre défini de leucocytes provenant du receveur pendant 2-3 jours. En cas d'histocompatibilité, il n'y a pas de modification du nombre des leucocytes (absence de stimulation). En cas d'incompa-

tibilité, on observe une prolifération qui peut se mesurer en comptant le nombre final de cellules (par exemple en comptant l'incorporation de thymidine tritiée, ou d'un colorant métabolisé par les cellules). La découverte de la région HLA-D, distincte des locus HLA-A et -B (HLA de classe I), a été le résultat de l'application de la MLC.

Certains produits ont été identifiés par des allosérums sur des lymphocytes B, constituant ainsi la série HLA-DR (D related, 1975), mais également les séries DR51, 52 et 53 (2ème molécules DR) et la série HLA-DQ. L'utilisation d'allosérums a permis, pour ces séries, de définir des spécificités qui correspondent à des gènes (ou groupes de gènes) alléliques, et d'en étudier la transmission. Autrement dit, les allèles ont tout d'abord été définis sérologiquement. En effet, chaque allèle était défini par un ou des anticorps reconnaissant sur la molécule un ou plusieurs épitopes. Les allosérums étaient sélectionnés pour leur capacité à reconnaître diverses molécules formant une série allélique.

Ultérieurement (1980), une quatrième série de classe II, HLA-DP, est décrite par la technique PLT (Primed Lymphocyte Test) qui utilise le principe de la MLR secondaire (en reprenant la description de la MLR primaire précédente, la MLR secondaire correspond à la stimulation des cellules R par de nouvelles cellules S irradiées à $J=14$). Cette technique permet ainsi de définir, pour cette série, des spécificités immunologiques et non plus sérologiques.

L'apport majeur de la biologie moléculaire à partir de la deuxième moitié des années 1980, outre la mise au point de techniques de typage, est la connaissance des séquences nucléotidiques des allèles des séries DR, DQ et DP, ce qui a permis une description précise de leur polymorphisme. Cela a de plus confirmé que les spécificités supertypiques et subtypiques définies sérologiquement ou immunologiquement étaient généralement hétérogènes et regroupaient en fait plusieurs allèles. Ainsi, la correspondance spécificités-allèles n'est pas parfaite, c'est-à-dire qu'une spécificité sérologique n'est pas associée à un seul allèle. Aujourd'hui, la nomenclature repose sur les allèles définis par leur séquence nucléotidique. L'attribution d'un nom à un allèle repose sur la correspondance spécificités-allèles (Tab. 1.1 et Fig. 1.3)

L'ensemble de ces techniques a donc permis en 20 ans :

- pour la première série HLA-DR, de passer de 7 puis 10 spécificités supertypiques à 14 spécificités subtypiques correspondant à plus de 200 allèles HLA-DRB1. Ces allèles sont regroupés en 13 séries alléliques (Tab. 1.1) ;

- pour la deuxième série HLA-DR, de passer de 3 spécificités supertypiques à 5 spécificités subtypiques correspondant à une quarantaine d'allèles HLA-DRB3, -DRB4 et -DRB5 (Tab. 1.1) ;
- pour la série HLA-DQ, de passer de 4 spécificités supertypiques à 7 spécificités subtypiques regroupant une soixante d'allèles HLA-DQA et HLA-DQB ;
- pour la série HLA-DP, de passer de 6 spécificités immunologiques à une centaine d'allèles HLA-DPA et HLA-DPB.

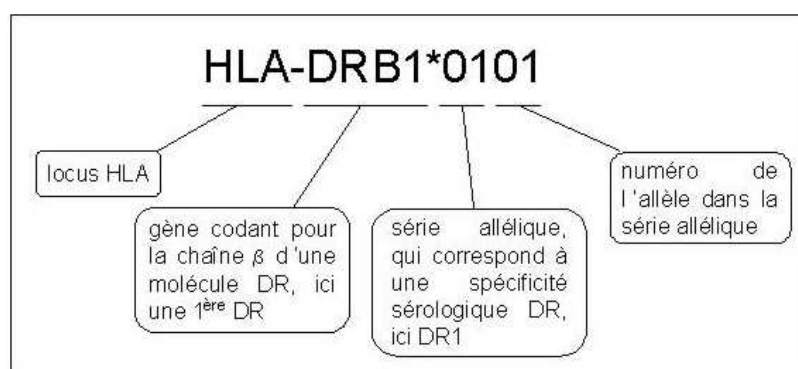


FIG. 1.3: Principe de nomenclature des allèles HLA-DRB.

La nomenclature des allèles HLA-DRB repose sur la correspondance établie entre les spécificités sérologiques HLA-DR et les allèles HLA-DRB (voir Tab. 1.1). Le nom de chaque allèle indique (1) le locus DRB (DRB1, DRB3, DRB4 ou DRB5), (2) la série allélique, qui correspond en fait à une spécificité sérologique, et (3) le numéro de l'allèle dans la série allélique.

1.2.2.2 Les haplotypes DR et DR-DQ forment des unités de polymorphisme

Comme nous venons de le voir, les allèles forment un premier niveau de polymorphisme. Il existe cependant deux autres unités de polymorphisme au sein de la région HLA de classe II : ce sont les haplotypes DR et DR-DQ.

Comme le montre la Fig. 1.2, la région DRA-DRB1 est très peu étendue sur le chromosome 6. Les locus compris dans cette région sont dits en déséquilibre de liaison, c'est-à-dire que la transmission à la descendance d'un locus n'est pas indépendante de celle des autres. Les locus ainsi associés forment des blocs ou haplotypes [Andersson et al., 1994]. Cinq structures différentes du segment chromosomique DRA-DRB1 ont été décrites (Fig. 1.4), elles forment les haplotypes DR.

| SPECIFICITES SEROLOGIQUES DR | | ALLELES DRB SEQUENCES | |
|------------------------------|-------------|-----------------------|--------|
| SUPERTYPIQUES | SUBTYPIQUES | SERIES ALLELIQUES | NOMBRE |
| DR1 | - | DRB1*01 | 12 |
| DR2 | DR15 | DRB1*15 | 19 |
| | DR16 | DRB1*16 | 9 |
| DR3 | DR17 | DRB1*03 | 28 |
| | DR18 | | |
| DR4 | - | DRB1*04 | 53 |
| DR5 | DR11 | DRB1*11 | 52 |
| | DR12 | DRB1*12 | 10 |
| DR6 | DR13 | DRB1*13 | 66 |
| | DR14 | DRB1*14 | 51 |
| DR7 | - | DRB1*07 | 7 |
| DR8 | - | DRB1*08 | 31 |
| DR9 | - | DRB1*09 | 2 |
| DR10 | - | DRB1*10 | 2 |
| DR52 | DR52a | DRB3*01 | 39 |
| | DR52b | DRB3*02 | |
| | DR52c | DRB3*03 | |
| DR53 | - | DRB4*01 et *02 | 12 |
| DR51 | - | DRB5*01 et *02 | 17 |

Les spécificités des molécules HLA-DR ont d'abord été reconnues sérologiquement. Sept puis 10 spécificités (DR1 à DR10) pour les premières molécules DR et trois (DR51 à DR53) pour les 2èmes ont ainsi été décrites (spécificités supertypiques). Les méthodes d'immunologie cellulaire et les études biochimiques ont rapidement montré que ces spécificités étaient hétérogènes, voire divisibles en plusieurs spécificités sérologiques dites subtypiques, elles mêmes encore hétérogènes. Puis, les méthodes de biologie moléculaire ont établi que chacune des spécificités regroupent en réalité plusieurs molécules codées par des allèles HLA-DRB différents dont le nombre ne cesse de croître au fur et à mesure de leur découverte. Les nombres d'allèles indiqués dans le tableau sont les dernières mises à jour de juillet 2003 du site Immunogenetics.

TAB. 1.1: Correspondance entre les spécificités DR définies sérologiquement et les allèles HLA-DRB

Enfin, les locus présents dans la région chromosomique plus étendue DRA-DQB1 sont également en fort déséquilibre de liaison, ce qui définit des haplotypes plus étendus DR-DQ [Colombani, 1993]. Au contraire, le déséquilibre de liaison entre DPB1 et le segment DQB1 et DRB1 est généralement faible et très peu d'associations DR-DQ-DP sont significatives.

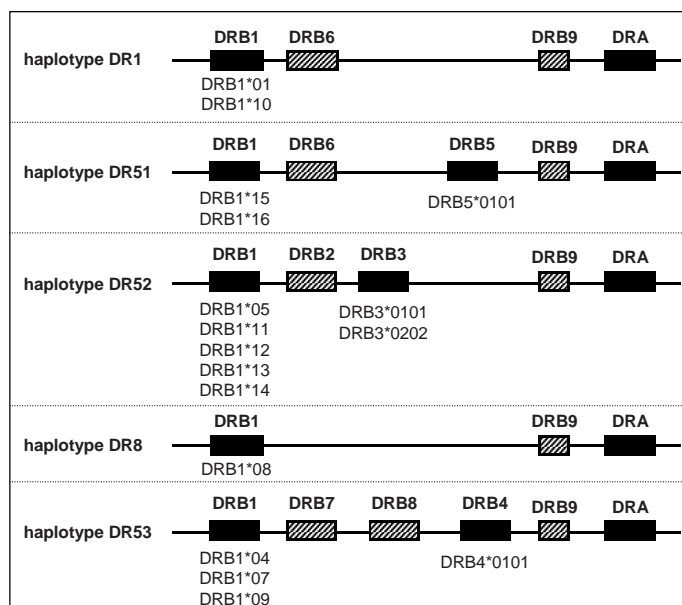


FIG. 1.4: Représentation schématique des cinq haplotypes DR.

Les gènes exprimés sont représentés par des rectangles noirs, les pseudogènes par des rectangles hachurés. Pour tous les haplotypes, l'allèle DRA exprimé est l'allèle DRA*0101.

1.2.2.3 Fréquence des allèles dans la population

Les fréquences géniques des différents allèles HLA II ont été étudiées dans différentes populations à travers le monde et regroupées notamment au cours de la 11ème International Histocompatibility WorkShop (IHWS) (résultats rapportés par [Colombani, 1993]). La distribution des différents allèles de classe II n'est pas uniforme dans la population mondiale mais varie d'une population à l'autre. Tab. 1.2 est un extrait des résultats obtenus pour les allèles DRB1. Ainsi, l'allèle DRB1*1304 représente à lui seul 25,3% des allèles de la population sénégalaise contre 0% en Allemagne et au Japon. L'allèle DRB1*0301 est, quant à lui, observé avec une fréquence de 10% chez les Sénégalais et les Allemands mais seulement de 0,4% chez les Japonais. En France,

| ALLELES | POPULATIONS CAUCASIENNES | | | | | | | | AUTRES | |
|-----------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|--------|------|
| | FRA | DAN | GER | ITA | ROU | SPA | US | CAN | SEN | JAP |
| DRB1*0101 | 9.3 | 13.0 | 6.7 | 6.5 | 7.6 | 6.6 | 7.3 | 5.6 | 0.6 | 4.9 |
| DRB1*0301 | 10.9 | 10.2 | 9.4 | 10.5 | 11.4 | 6.7 | 9.5 | 12.3 | 10.2 | 0.4 |
| DRB1*0401 | 5.6 | 17.6 | 8.1 | 2.3 | 4.2 | 5.6 | 6.7 | 9.5 | - | 1.8 |
| DRB1*0701 | 14.0 | 14.8 | 12.3 | 12.5 | 8.3 | 18.9 | 14.4 | 9.4 | 7.8 | 0.6 |
| DRB1*1101 | 9.2 | 0.9 | 9.2 | 12.4 | 7.3 | 1.0 | 4.4 | 2.6 | 9.3 | 2.0 |
| DRB1*1301 | 6.0 | 8.3 | 4.5 | 4.8 | 4.4 | 4.5 | 5.1 | 4.7 | 4.7 | 0.7 |
| DRB1*1501 | 8.0 | 17.6 | 7.8 | 5.6 | 6.2 | 9.4 | 10.3 | 10.4 | - | 6.8 |
| Total | 63.0 | 82.0 | 58.0 | 55.0 | 49.0 | 53.0 | 58.0 | 55.0 | 33.0 | 17.0 |
| DRB1*1304 | - | - | - | 0.2 | - | - | - | - | 25.3 | - |
| DRB1*0405 | 1.6 | - | 0.6 | - | 0.7 | 2.1 | 0.7 | - | 0.6 | 12.3 |

Valeurs tirées de Colombani, 1993. Abréviations : FRA : France, DAN : Danemark, GER : Allemagne, ITA : Italie, ROU : Roumanie, SPA : Espagne, US : États-Unis, CAN : Canada, SEN : Sénégal, JAP : Japon.

TAB. 1.2: Fréquences géniques (en %) de différents allèles HLA-DRB1

seuls sept allèles dépassent les 5%. Il s'agit des allèles DRB1*0101, *0301, *0401, *0701, *1101, *1301 et *1501. Ils représentent à eux seuls 63% de la fréquence génique, autrement dit 86% des individus possèdent au moins un de ces sept allèles. Ces mêmes allèles sont aussi les plus abondants dans les autres populations caucasiennes. Leurs fréquences géniques cumulées varient en effet de 53% (en Espagne) à 82% (au Danemark), avec 58 et 55% pour les États-Unis et le Canada respectivement.

1.2.3 Distribution et régulation de l'expression des molécules HLA II

Les molécules de CMH se différencient à plusieurs niveaux : distribution histologique, structure fine et mode de liaison des peptides [Madden, 1995]. Bien que cette partie soit consacrée à la description des seules molécules de classe II, nous présentons cependant rapidement les molécules de classe I.

Les molécules de HLA I (A, B, C) ont une distribution tissulaire et cellulaire quasi-ubiquitaire puisqu'elles sont exprimées à la surface de presque toutes les cellules nucléées de l'organisme (sauf sur le système nerveux central, le pancréas endocrine et

les trophoblastes villos du placenta).

Les molécules HLA de classe II sont exprimées de façon constitutive, principalement à la membrane d'APCs comme les lymphocytes B et des cellules professionnelles présentatrices telles que les macrophages, les cellules dendritiques interstitielles, les cellules de Langerhans de la peau. Elles sont également présentes à la surface des lymphocytes T activés et des précurseurs érythrocytaires, granulocytaires et monocytaires. Pour les lymphocytes B et T, l'expression du HLA II dépend respectivement de leur état de différenciation et de leur état d'activation. En effet, seules les cellules B matures expriment les molécules de HLA II à la différence des cellules immatures et des plasmocytes, alors que les lymphocytes T doivent être activés pour exprimer ces molécules à leur surface. Dans le thymus, les molécules HLA II sont exprimées sur les cellules épithéliales du cortex et de la médulla ainsi que sur les cellules dendritiques d'origine hématopoïétique. Enfin, certains tissus non lymphoïdes, comme les endothéliums capillaires, de nombreux épithéliums (langue, duodénum, épididyme, sein, trachée, etc.), les glomérules rénaux et la dure-mère, expriment également les produits de classe II. Il semblerait que cette expression soit constitutive [Colombani, 1993].

Les cellules humaines homozygotes pour chaque locus HLA II expriment trois ou quatre molécules HLA II suivant leur haplotype DR : une ou deux molécules DR, une molécule DQ et une molécule DP. Une évaluation très approximative de la part de chaque population de molécules dans l'ensemble des molécules de classe II exprimées sur une cellule B en culture est : 1ère DR = 55%, 2ème DR = 15%, DQ = 15% et DP = 15% [Colombani, 1993].

De nombreux facteurs régulent l'induction ou l'augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II. L'IFN- γ est une cytokine qui induit leur expression sur un grand nombre de cellules. L'IL-4 et l'IL-13 sont également capables d'augmenter leur expression sur certaines cellules. Lors du processus de maturation des cellules dendritiques sous l'action du CD40L, du LPS et/ou du TNF- α les molécules HLA-II voient leur expression augmentée. A l'inverse, il existe des facteurs qui régulent négativement l'expression des molécules de classe II : l'IFN- β , le TGF- β et l'IL-10.

1.3 Interaction peptide-molécule HLA II

1.3.1 Structure des molécules HLA II

Les molécules de CMH sont des glycoprotéines transmembranaires. Celles de classe I sont des dimères composés d'une chaîne lourde avec trois domaines extracellulaires (notés α_1 , α_2 , α_3) et d'une soluble β_2m). Les protéines de classe II forment de façon non covalente un hétérodimère de chaînes α et β pour DP et DQ, et un ou deux hétérodimères pour DR. Chaque chaîne est composée de deux domaines extracellulaires (notés α_1/α_2 et β_1/β_2), d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique (12-18 acides aminés) [Mcdevitt, 1995](Fig.1.5 1.6). Les domaines proximaux de membrane (α_2 et β_2) contiennent chacun un pont disulfure interne et sont structurellement semblables aux domaines constants d'immunoglobuline [Kappes and Strominger, 1988]. Les domaines distaux de membrane (α_1 and β_1) s'associent pour former la structure qui constitue le site de fixation peptidique. Cette structure ressemble étroitement à celle des molécules de la classe I, qui dans le dernier cas est produite par les deux domaines N-terminal (α_1/α_2) [Bjorkman et al., 1987, Fremont et al., 1992].

La structure du site de fixation peptidique de HLA II avait été initialement prédite à partir des similitudes de séquence et de l'emplacement des résidus conservés et polymorphes entre les domaines α_1 et α_2 de la classe I et α_1 and β_1 de la classe II(19). L'organisation générale de la structure prédite a été confirmée par l'analyse cristallographique aux rayons X [Brown et al., 1993]. La structure comporte huit feuillet- β anti-parallèles sur lesquels reposent deux hélices- α anti-parallèles. Le sillon situé entre les hélices α constitue le site de fixation des peptides. Quatre des huit brins au feuillets- β et une hélice- α sont dérivés de chaque sous-unité.

La première structure tridimensionnelle d'une molécule HLA-II résolue est celle de HLA-DR1 (DRA*0101/DRB1*0101) complexé avec le peptide HA 306-318 issu de l'hémagglutinine du virus de la grippe [Brown et al., 1993, Stern et al., 1994]. Depuis, les structures 3D d'autres molécules de CMH de classe II humaines et murines ont été publiées (Tab. 1.3) et mettent en évidence une organisation structurale identique (Fig. 1.5 1.6). Chaque domaine α_2 et β_2 juxta-membranaire se replie en feuillets β antiparallèles associés par un pont disulfure. Les deux domaines ainsi formés inter-

agissent entre eux par leurs feuillets β et supportent les domaines N-terminaux α_1 et β_1 . Ces derniers, structuralement très proches et symétriques, se replient chacun en un feuillet β antiparallèle surmonté d'une longue région en hélice α d'environ 30 résidus. Ces deux feuillets β , l'un appartenant au domaine α_1 et l'autre à β_1 , s'associent par des liaisons hydrogène pour former un unique feuillet β à huit brins surmonté des 2 hélices α des domaines α_1 et β_1 . De cette dimérisation naît un profond sillon (longueur 2,5 nm ; largeur 1nm) entre les 2 hélices α , ayant comme plancher les chaînes latérales des brins centraux du feuillet β né de l'association α_1 - β_1 [Jardetzky et al., 1994]. Cette cavité, ouverte à ses extrémités, présente 5 poches de taille et de nature physico-chimique différentes selon la protéine de CMH. C'est le site fonctionnel de la molécule de CMH II où se fait la liaison des peptides présentés.

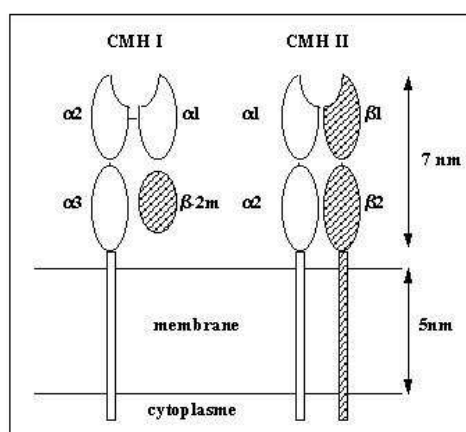


FIG. 1.5: Schéma général des molécules de CMH I et de CMH II.

1.3.2 Structure du complexe CMH-peptide

Les molécules HLA II possèdent une structure tridimensionnelle très proche, mais le site de fixation peptidique des molécules HLA II est un sillon ouvert aux deux extrémités. Ceci explique pourquoi les peptides restreints aux molécules HLA II acceptent des peptides de taille qui varie de 12 à 25 de résidus avec toutefois une préférence pour 15 résidus [Rudensky et al., 1991, Chiczy et al., 1992, Chiczy et al., 1993]. En effet, les extrémités de ces peptides sont libres et peuvent s'étendre en dehors du sillon de liaison. Cependant, seuls 12 à 13 résidus du peptide sont bien ordonnés dans les cristaux, ce qui suggère que la zone d'interaction avec la molécule de CMH II a une

| HLA | ID. PDB | DESCRIPTION | ANNEE | AUTEURS |
|--------|------------|---|-------|---------------------|
| DR1 | 1DLH | complexé avec le peptide HA | 1994 | Stern et al. |
| | 1SEB | complexé avec le superantigène SEB ⁽¹⁾ | 1995 | Jardetsky TS et al. |
| | 1AQD | complexé avec le peptide endogène HLA A2 103-117 | 1997 | Murthy VL et al. |
| | 1FYT | complexe stable TCR $\alpha\beta$ /peptide HA/HLA-DR1 | 2000 | Hennecke J et al. |
| | 1KG0 | complexé avec la protéine gp42 de EBV | 2001 | Mullen MM et al. |
| | 1HXY | complexé avec le superantigène SEH ⁽²⁾ | 2001 | Petersson K et al. |
| | 1JWM | complexé avec le superantigène SEC-3 ⁽³⁾ | 2001 | Sundberg EJ et al. |
| | 1JWS | complexé avec le variant SEC-3b1 de SEC-3 ⁽³⁾ | 2001 | Sundberg EJ et al. |
| | 1JWU | complexé avec le variant SEC-3b2 de SEC-3 ⁽³⁾ | 2001 | Sundberg EJ et al. |
| | 1KLG | complexé avec le peptide TPI ⁽⁴⁾ 23-37 non muté | 2001 | Sundberg EJ et al. |
| | 1KLU | complexé avec la forme mutée oncogène de TPI ⁽⁴⁾ (T23I) | 2001 | Sundberg EJ et al. |
| | 1LO5 | complexé avec le variant D227A de SEA ⁽⁵⁾ | 2002 | Petersson K et al. |
| DR3 | 1A6A | complexé avec CLIP | 1998 | Ghosh P et al. |
| DR4 | 2SEB | complexé avec le peptide 261-273 du collagène II | 1997 | Dessen A et al. |
| | 1D5M | | 1999 | Swain A et al. |
| | 1D5X | complexes de DR4 avec un peptide de haute affinité ou un des trois peptides mimétiques dérivés, toujours en association avec SEB ⁽¹⁾ | 1999 | Swain A et al. |
| | 1D5Z | | 1999 | Swain A et al. |
| | 1D6E | | 1999 | Swain A et al. |
| | 1J8H | complexe stable TCR $\alpha\beta$ /peptide HA/HLA-DR4 | 2002 | Hennecke J et al. |
| DR15 | 1BX2 | complexé avec le peptide MBP ⁽⁶⁾ 85-99* | 1998 | Smith KJ et al. |
| DRB5 | 1HQR | complexé avec le superantigène SPE-C ⁽⁷⁾ | 2000 | Li Y et al. |
| | 1FV1 | complexé avec le peptide MBP ⁽⁶⁾ 86-105* | 2000 | Li H et al. |
| | 1H15 | complexé avec un peptide de la DNA polymérase de EBV | 2002 | Lang H et al. |
| DQ1 | 1BXT | complexé avec le superantigène SPE-C ⁽⁷⁾ | 1998 | Sunberg EJ et al. |
| DQ8 | 1JK8 | complexé avec un peptide immunodominant de l'insuline | 2001 | Lee KH et al. |
| AUTRES | 1HDM | structure de la protéine HLA-DM | 1998 | Mosyak L et al. |
| | 1IIE | structure du nonamères ($\alpha\beta$ li) ³ | 1999 | Jasanoff et al. |

L'ID. PDB est l'identifiant de la structure dans la Proteine Data Bank (www.pdb.org).

⁽¹⁾SEB = Staphylococcus aureus enterotoxin B; ⁽²⁾SEH = Staphylococcus aureus enterotoxin H; ⁽³⁾SEC-3 = staphylococcal enterotoxin C-3; ⁽⁴⁾TPI = triosephosphate isomerase; ⁽⁵⁾SEA = staphylococcal enterotoxin A;

⁽⁶⁾MBP = myelin basic protein; ⁽⁷⁾SPE-C = Streptococcal pyrogenic endotoxine C.

TAB. 1.3: Liste des structures tridimensionnelles de molécules HLA II répertoriées dans la PDB

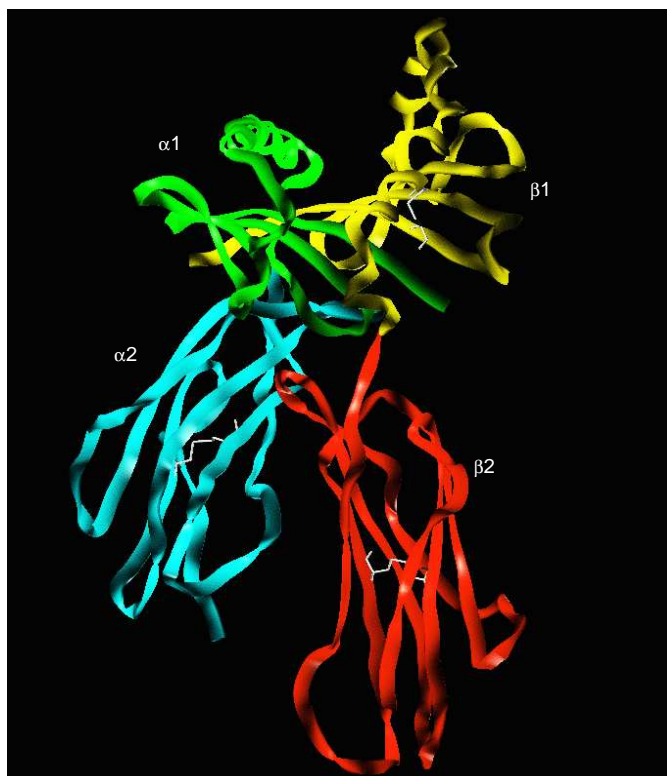


FIG. 1.6: Structure de la molécule HLA de classe II.

La molécule HLA de classe II est formée de deux chaînes de deux domaines chacune : - chaîne a : $\alpha 1$ (vert), $\alpha 2$ (bleu) - chaîne b : $\beta 1$ (jaune), $\beta 2$ (rouge). Les ponts disulfures sont indiqués en blanc.
Figure réalisée par C. Texier avec SYBYL.

longueur de cet ordre (Fig. 1.7). Sur cette zone, le peptide adopte une conformation étendue et enroulée où les chaînes latérales successives forment un angle d'environ 130° et sont projetées soit vers l'intérieur du sillon soit vers le solvant. Cette conformation est caractéristique de l'hélice polyproline de type II [Jardetzky et al., 1996]. Elle est maintenue par un réseau d'une quinzaine de liaisons hydrogène entre la chaîne principale du peptide et des résidus de la molécule de CMH II qui sont, dans leur immense majorité, des résidus conservés.(Fig. 1.8)

La formation du complexe CMH-peptide met également en jeu des interactions entre certaines chaînes latérales du peptide et les poches du sillon. Les acides aminés du peptide ont été numérotés de P1 à P9 par Stern et al [Stern et al., 1994] en fonction de leur position par rapport aux poches du site de liaison. Ainsi, le résidu en position P1 a sa chaîne latérale enfouie dans la profonde poche hydrophobe située à l'une des extrémités du sillon. Les autres résidus enfouis, ou résidus d'ancrage, sont

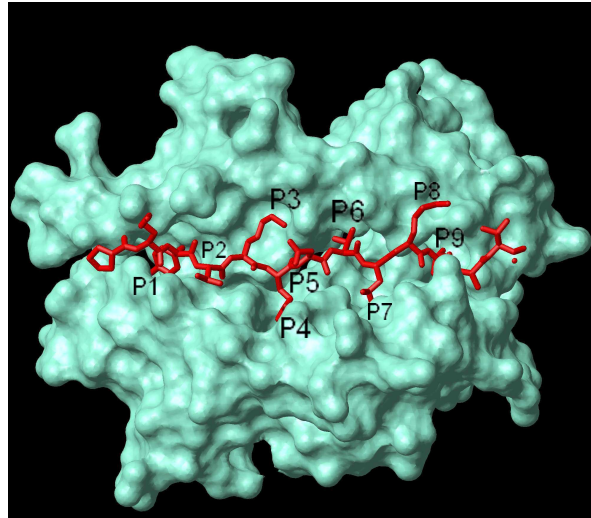


FIG. 1.7: Complexe peptide - molécule de CMH II.

Le complexe présenté est celui de DRA / DRB1*0101 (représentée en vert clair par une surface de Van Der Waals) avec le peptide HA 306-318 (en rouge). Les positions du peptide interagissant avec des poches du sillon sont P1, P4, P6, P7 et P9. Les résidus dont les chaînes latérales pointent vers l'extérieur sont P2, P5 et P8. L'acide aminé en P3 présente une situation intermédiaire. *Figure réalisée par C. Texier avec Molmol.*

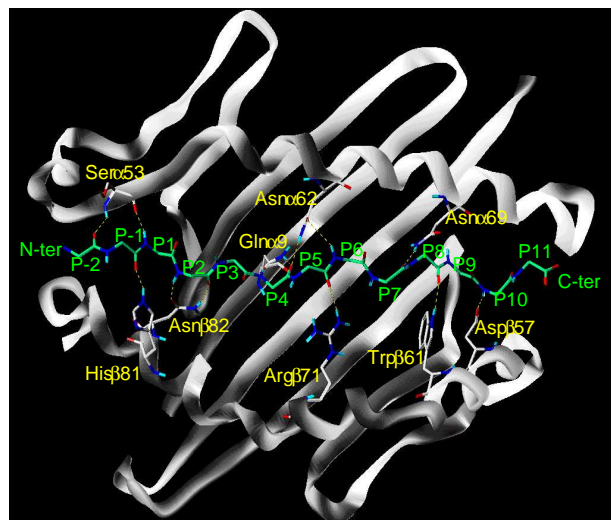


FIG. 1.8: Réseau de liaisons hydrogène entre le squelette du peptide et la molécule de CMH II.

La molécule de CMH (ici DRB1*0101) est représentée en blanc et le peptide (HA 306-318) en vert. Les atomes d'oxygène, d'hydrogène et d'azote sont respectivement représentés en rouge, bleu ciel et bleu foncé. Les liaisons hydrogène sont indiquées par des tirets jaunes. Les positions du peptide sont numérotées d'après [Stern et al., 1994]. *Figure réalisée par C. Texier avec SYBYL.*

en position P4, P6, P7 et P9. Les résidus P2, P5 et P8 pointent vers le solvant. Le résidu P3 présente une position intermédiaire. Chaque poche, en fonction de ses caractéristiques (taille, hydrophobicité, charge) accepte certaines chaînes latérales et pas d'autres, ce qui est à l'origine de la spécificité de liaison des molécules de CMH II. La détermination des acides aminés acceptés ou repoussés par chacune des 5 poches de spécificité (P1, P4, P6, P7 et P9) d'une molécule de CMH II donnée permet de définir son motif de liaison.

1.3.3 Le polymorphisme de HLA II contrôle les motifs de liaison

Le polymorphisme important de HLA II se traduit au niveau fonctionnel par des molécules ayant chacune leurs propres propriétés de liaison (motif de liaison). En effet, le polymorphisme allélique se retrouve concentré dans les régions de la protéine qui correspondent au sillon de liaison des peptides. Des différences de spécificité de liaison sont observées aussi bien entre séries, en particulier DR et DQ, [Raddrizzani et al., 1997], qu'entre molécules d'une même série. Les molécules de la série DRB1 (1ères molécules DR) dont les spécificités sont les mieux décrites illustreront ce paragraphe. Nous ne parlerons pas ici des motifs de liaison des molécules HLA-DQ et la question des molécules HLA-DP sera abordée plus loin.

1.3.3.1 Résidus polymorphes et spécificités des molécules HLA-DR

Les acides aminés polymorphes sont principalement localisés sur les deux premiers brins β du feuillet $\beta 1$ et sur la première moitié de l'hélice α de ce même domaine. 18 résidus polymorphes participent directement à l'architecture des poches du sillon qui accommodent les chaînes latérales du peptide ligand (Tab. 1.4). Ainsi, ces résidus polymorphes déterminent les caractéristiques physico-chimiques de ces poches et donc les spécificités de liaison des molécules de CMH II. Certains de ces résidus ont à eux seuls un effet drastique sur la spécificité de liaison. Il est ainsi couramment admis que la taille de la poche P1 est sous le contrôle du résidu $\beta 86$ où il est observé un dimorphisme glycine/valine [Newton-Nash and Eckels, 1993, Marshall et al., 1994, Davenport et al., 1995]. Lorsqu'il y a une glycine à cette position, la poche accepte des gros résidus aromatiques (tyrosine et tryptophane), ce qui n'est

| POSITIONS | MOLECULES DR | | | | | | | | | |
|--------------|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| POLY-MORPHES | | | | | | | | | | |
| | B1*0101 | B1*0301 | B1*0401 | B1*0701 | B1*1101 | B1*1301 | B1*1501 | B3*0101 | B4*0101 | B5*0101 |
| $\beta 9$ | W | E | E | W | E | E | W | E | E | Q |
| $\beta 11$ | L | S | V | G | S | S | P | R | A | D |
| $\beta 13$ | F | S | H | Y | S | S | R | S | C | Y |
| $\beta 26$ | L | Y | F | F | F | F | F | Y | N | F |
| $\beta 28$ | E | D | D | E | D | D | D | D | I | H |
| $\beta 30$ | C | Y | Y | L | Y | Y | Y | Y | Y | D |
| $\beta 37$ | S | N | Y | F | Y | N | S | F | Y | D |
| $\beta 47$ | Y | F | Y | Y | F | F | F | Y | Y | Y |
| $\beta 57$ | D | D | D | V | D | D | D | V | D | D |
| $\beta 60$ | Y | Y | Y | S | Y | Y | Y | S | Y | Y |
| $\beta 67$ | L | L | L | I | F | I | I | L | L | F |
| $\beta 70$ | Q | Q | Q | D | D | D | Q | Q | R | D |
| $\beta 71$ | R | K | K | R | R | E | A | K | R | R |
| $\beta 74$ | A | R | A | Q | A | A | A | R | E | A |
| $\beta 77$ | T | N | T | T | T | T | T | N | T | T |
| $\beta 78$ | Y | Y | Y | V | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| $\beta 81$ | H | H | H | H | H | H | H | H | Y | H |
| $\beta 86$ | G | V | G | G | G | V | V | G | V | G |

(séquences sur le site Internet ImMunoGeneTics à l'adresse <http://imgt.cines.fr>)

TAB. 1.4: Résidus présents aux différentes positions polymorphes du sillon de liaison des peptides des molécules HLA-DR utilisées dans ce travail

pas le cas lorsqu'il y a une valine. Au niveau de la poche P4, la liaison d'un résidu chargé négativement est favorisée par la présence d'un résidu $\beta 74$ avec une charge positive [Ghosh et al., 1995]. Le résidu $\beta 11$ contrôle lui la taille et la polarité de la poche P6 [Hammer et al., 1993]. Cependant, c'est principalement une combinaison de résidus polymorphes qui contrôle la spécificité de liaison de chaque poche. Ainsi, pour chaque poche d'une molécule de CMH II donnée, des acides aminés pouvant s'y accommoder ou étant strictement incompatibles, définissent des motifs de liaison qui caractérisent sa spécificité de liaison.

1.3.3.2 Caractérisation des motifs de liaison

De très nombreux travaux ont été dédiés à l'identification de ces motifs de liaison [Hammer et al., 1997]. Les premières études ont débuté, avant la résolution de la première structure d'une molécule de classe II, par homologie avec celle de classe I. Différentes techniques sont utilisées. Certaines consistent en l'analyse d'importants jeux de peptides qui sont sélectionnés dans des bibliothèques de peptides exprimés à la surface du bactériophage M13 [Hammer et al., 1992, Hammer et al., 1993, Hammer et al., 1994a] ou qui sont élués de molécules de CMH II purifiées (peptides endogènes ou naturellement présentés) [Falk et al., 1994, Verreck et al., 1994]. Le séquençage de ces peptides permet de rechercher des alignements qui font ressortir des motifs de liaison. L'alignement des peptides endogènes est cependant difficile à réaliser en raison de la variabilité de leur longueur [Chicz et al., 1992, Chicz et al., 1993]. De plus, les extrémités du sillon de classe II étant ouvertes, un même peptide peut s'y lier de plusieurs façons.

Une autre technique d'identification des motifs de liaison consiste à caractériser les effets de la substitution, par différents types d'acides aminés, de chaque résidu d'un peptide ligand. Dans le cas de DRB1*0101, l'importance d'un résidu aromatique à la position P1 a été initialement trouvée à l'aide de substitutions des acides aminés du peptide HA 306-318 avec des alanines [Jardetzky et al., 1990]. Des tronçonnements plus extensifs, combinés à des substitutions simples sur les peptides HA 306-318 et TT 830-843, ont révélé des motifs de liaison pour DRB1*0401, *1101 et *0701, en plus de DRB1*0101 [Krieger et al., 1991, O'Sullivan et al., 1991, Sette et al., 1993]. Des substitutions simples ont également été réalisées sur le peptide 3-13 de la protéine hsp 65 mycobactérienne [Geluk et al., 1992, Sidney et al., 1992] et sur des ligands naturellement présentés [Malcherek et al., 1993], ce qui a souligné l'importance d'un résidu aspartate en P4 pour l'allèle DRB1*0301. Enfin, des substitutions sur le peptide MBP 84-102 ont révélé des motifs de liaison différents entre DRB1*1501 et DRB5*0101 [Vogt et al., 1994, Wucherpfennig et al., 1994].

Les effets (favorables, défavorables ou neutres) observés dans ces expériences de substitutions suggèrent que chaque résidu d'un peptide contribue à l'affinité globale du peptide indépendamment des résidus voisins. Différents auteurs ont essayé de résumer ces effets dans des matrices quantitatives qui permettent d'attribuer une

note au peptide en fonction de l'acide aminé présent à chaque position du peptide ou au niveau des cinq poches [Hammer et al., 1994b, Hammer et al., 1995, Marshall et al., 1995, Hammer et al., 1997, Southwood et al., 1998, Sturniolo et al., 1999]. Plus la note obtenue est élevée, plus le peptide a de chance d'être ligand, le problème étant de définir un seuil de prédiction réaliste. C'était avec cette technique que nous avons caractérisé le motif de liaison de HLA-DP4 [Castelli et al., 2002]. Nous en parlerons plus loin.

Tab. 1.5 présente quelques uns des motifs de liaison décrits pour les molécules HLA-DR. On peut remarquer que chaque poche a une spécificité relativement lache (ou dégénérée) ce qui explique pourquoi les molécules de CMH II peuvent tout de même lier une grande variété de peptides et pourquoi ces motifs sont difficiles à mettre en évidence.

Ainsi, chaque molécule de CMH II possède ses propres propriétés de liaison en fonction des résidus polymorphes présents dans le site de liaison des peptides. Elle lie donc un répertoire de peptides qui lui est propre et qui diffère de celui ce liant à une autre molécule. La spécificité large des molécules de CMH II, l'existence de plusieurs isoformes et d'un polymorphisme important font que de nombreux fragments différents d'une même protéine peuvent être chargés sur les molécules de CMH II et donc être présentés aux lymphocytes T.

1.4 La présentation de l'antigène

L'activation des cellules T helper CD4+ (T auxiliaires) est un évènement crucial dans l'induction d'une réponse immunitaire. Contrairement aux cellules B qui lient directement l'antigène, les cellules T ne reconnaissent l'antigène qu'en association aux produits du CMH exprimés à la surface des cellules APCs. L'antigène n'est pas reconnu sous sa forme native, mais uniquement après avoir subi des transformations physicochimiques (le *processing* des anglo-saxons). C'est cette forme modifiée de l'antigène qui, complexée aux molécules du CMH de l'APC, est reconnue par le TCR (Fig. 1.9).

| MOLECULES | | POSITIONS | | | | | | | |
|-----------|------------|-----------|----|--------------------------|----|-----|-----------------------|----|----------------|
| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | P9 |
| DRB1*0101 | Y V | | | L A | | A G | | | |
| | L F | | | I V | | S T | | | |
| | I A | | | M N | | P | | | |
| | M W | | | Q | | | | | |
| DRB1*0301 | L I | | | D | | K R | | | Y L |
| | F M | | | | | E Q | | | F |
| | V | | | | | N | | | |
| DRB1*0401 | F Y | | | F W | | N S | polaire chargé ali | | polaire ali |
| | W I | | | I L | | T Q | | | |
| | L V | | | V A | | H R | | | |
| | M | | | D E | | | | | |
| | | | | pas R K | | | | | |
| DRB1*1101 | W Y | | | M L | | R K | | | |
| | F | | | V I | | | | | |
| DRB1*1501 | L V | | | F Y | | | I L | | |
| | I | | | I | | | V M | | |
| | | | | | | | F | | |
| DRB5*0101 | F Y | | | Q V | | | | | R K |
| | L M | | | I M | | | | | |

Ali : résidu aliphatique ; en gras : les préférences fortes. (d'après [Rammensee et al., 1995])

TAB. 1.5: Motifs de liaison proposés pour quelques molécules HLA-DR

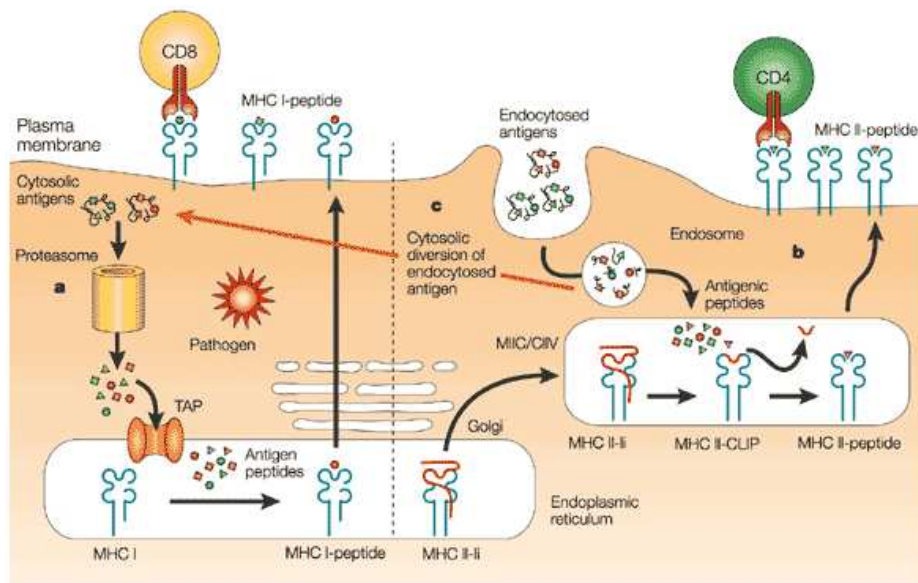


FIG. 1.9: Les voies de présentation de l'antigène.

a) Les molécules de classe I présentent des peptides issus des protéines du soi ou d'un pathogène et néosynthétisées dans le cytoplasme de la cellule (endogènes). Ces protéines sont découpées en fragments peptidiques par le protéasome, ceux-ci sont ensuite transportés par la protéine transmembranaire TAP dans le RE puis chargés sur les molécules de classe I nouvellement synthétisées. Ces dernières, une fois le peptide fixé, sont dirigées vers la membrane cytoplasmique où elles vont présenter le déterminant antigénique qu'elles contiennent aux lymphocytes T CD8⁺. b) De façon complémentaire, les molécules de CMH de classe II présentent des peptides antigéniques issus de protéines qui entrent dans la cellule par la voie endocytaire. Tout au long de leur synthèse dans le RE, les molécules de CMH de classe II ne peuvent pas lier les peptides endogènes car leur site de liaison est bloqué par la chaîne invariante (Ii). Les complexes CMH II / Ii transitent tout au long du compartiment de Golgi pour finalement être regroupés dans des vésicules appelées CIIV. Ces vésicules fusionnent ensuite avec les endosomes précoces remplis de fragments d'antigènes exogènes. Il se forme alors un nouveau compartiment nommé MIIC/CIIV. La chaîne invariante y est dégradée par ses extrémités jusqu'à ce qu'il ne reste plus que le fragment associé au site de liaison de la molécule, le peptide CLIP. Ce peptide est ensuite remplacé par un peptide antigénique grâce à l'intervention de la molécule HLA-DM, et le complexe CMH II / peptide formé est transporté vers la membrane plasmique où il est présenté aux lymphocytes T CD4⁺. c) Les cellules dendritiques, contrairement aux autres cellules présentatrices, ont la propriété de présenter des peptides exogènes aux lymphocytes T CD8⁺. Ce phénomène très étudié mais encore non élucidé, est appelé cross-présentation. Le mécanisme est TAP-dépendant ce qui indique l'existence d'une étape de réorientation des peptides antigéniques endocytés vers la voie de présentation classe I conventionnelle. Dans tous les cas, ces antigènes sont apprêtés par les molécules de CMH de classe II.

1.4.1 Dégredation des protéines en fragments peptidiques

Les molécules de classe II sont spécialisées dans la fixation de peptides provenant d'antigènes exogènes, internalisés depuis l'environnement extracellulaire par endocytose. Les protéines exogènes intègrent successivement les différents compartiments de la voie endocytaire où elles sont dégradées par diverses enzymes protéolytiques (Fig. 1.9). En effet, les protéines nécessitent un apprêtement intracellulaire générant des peptides capables de s'associer aux molécules du CMH de façon efficace.

L'efficacité et la qualité de l'apprêtement de l'antigène dépendent de la complexité de la protéine à dégrader, de ses sites d'action pour les protéases et de la nécessité de dénaturer la protéine avant sa protéolyse. Par exemple, certains antigènes, comme le lysozyme, l'insuline ou la toxine a de serpent, nécessitent la réduction de ponts disulfures préalablement à l'action des protéases. L'activité optimale des protéases requiert un pH acide entre 3 et 6, par conséquent leur efficacité sera modulée en fonction du compartiment endocytaire où elles agissent. Ainsi, des antigènes encapsulés dans des liposomes se dissociant au pH des lysosomes sont apprêtés plus efficacement que des antigènes transportés dans des liposomes libérant l'antigène au niveau des endosomes plus précoces. De nombreuses familles de protéases sont présentes dans les compartiments endocytiques, dont les cathepsines. On distingue les cathepsines B, H, L (cystéine protéases) et les cathepsines D et E (aspartyl protéases), qui ont pu être colocalisées avec les molécules de classe II dans ces vésicules. Chaque protéase est caractérisée par des sites préférentiels de clivage et l'action simultanée de plusieurs protéases a été mise en évidence pour certains antigènes.

Au contraire, les molécules de classe I présentent des protéines endogènes, produites dans le cytoplasme de la cellule au cours du renouvellement des protéines cellulaires ou au cours d'infections bactériennes ou virales ou encore lors du développement de tumeurs. Ces protéines sont dégradées en fragments peptidiques dans le cytosol (Fig. 1.9). La protéolyse est assurée par un complexe multiprotéique, appelé protéasome, dont certaines sous-unités sont codées par des gènes inductibles par l'IFN- γ , LMP2 et LMP7. Ce processus est dépendant de l'ATP et se déroule généralement après ubiquitination des protéines. L'activité enzymatique du protéasome est modulée par l'expression différentielle de certaines sous-unités par rapport à d'autres.

Cette corrélation entre l'origine des antigènes et la classe de molécule du CMH

à laquelle ils s'associent, comporte des exceptions au cours desquelles des antigènes endogènes sont présentés par des molécules de classe II, ou des antigènes exogènes peuvent être associés à des molécules de classe I (Fig. 1.9). Par exemple, de fortes doses d'ovalbumine sous forme soluble peuvent être présentées en association aux molécules de classe I. Une présentation efficace d'antigène exogène par des molécules de classe I est observée, *in vitro* et *in vivo*, lorsque la protéine est couplée à des particules synthétiques de latex. Les macrophages sont responsables de cette voie de présentation grâce à la phagocytose des particules qui transitent par les phagolysosomes et se retrouvent ensuite dans le cytosol des macrophages, devenant ainsi accessibles à la voie endogène classique de présentation par les molécules de classe I. Un autre mécanisme a également été suggéré au cours duquel les peptides sont générés dans les compartiments intracellulaires des macrophages puis libérés pour se fixer aux molécules de classe I présentes à la surface d'autres cellules. Par ailleurs, il a été démontré que les macrophages sont capables d'internaliser des antigènes solubles depuis le milieu extracellulaire par un processus de macropinocytose, conduisant les antigènes dans le cytosol. Les macrophages sont également capables de présenter des antigènes exprimés dans des bactéries *Escherichia coli* ou des salmonelles recombinantes ou des antigènes dérivés du parasite intracellulaire *Leishmania major*, en association à des molécules de classe I.

1.4.2 Transport des molécules de classe II et fonction de la chaîne invariante

Les molécules de classe II sont synthétisées dans le RE, où s'associent trois dimères $\alpha\beta$ avec un trimère de chaîne invariante (Ii) et les nonamères ainsi formés sont exportés vers les endosomes via l'appareil de Golgi [Roche et al., 1991, Cresswell, 1992, Cresswell, 1996]. La chaîne invariante est une protéine chaperonne qui exerce plusieurs fonctions auprès des molécules de classe II.

Tout d'abord, elle contribue à l'assemblage des chaînes α et β nouvellement synthétisées et assure leur stabilisation dans le réticulum sous une conformation permettant leur transport vers la voie endocytaire [Bikoff et al., 1993, Viville et al., 1993, Elliott et al., 1994]. Elle empêche également la fixation de peptides endogènes, présents dans le réticulum ou le réseau de Golgi, aux molécules de classe II [Roche et al., 1992] et

permet donc la séparation des voies de présentation CMH I et CMH II [Teyton et al., 1990]. De plus, des signaux localisés dans la région cytoplasmique de la chaîne invariante sont responsables du transport des molécules de classe II depuis le réticulum endoplasmique vers la voie endocytaire [Pieters et al., 1993, Odorizzi et al., 1994].

Au niveau des endosomes, la chaîne invariante est progressivement dégradée par des protéases auxquelles résistent les molécules de classe II [Maric et al., 1994, Roche and Cresswell, 1991]. Quelques fragments peptidiques restent temporairement associés aux dimères $\alpha\beta$ de molécules de classe II. En particulier, différents peptides de la région 81-104, appelés peptides CLIP (pour “class II associated invariant chain peptides”), isolés lors de l’élution des peptides naturels associés aux molécules de classe II, sont associés au dimère $\alpha\beta$ et permettent d’empêcher la fixation de peptides endogènes [Roche et al., 1991].

Deux modes d’interaction ont été envisagés pour les peptides CLIP. D’une part, les motifs d’interaction de CLIP avec les molécules de classe II sont semblables aux motifs des peptides ligands naturels et cette interaction est modulée par le polymorphisme allélique des molécules de classe II, ceci suggérant la fixation de CLIP dans le sillon peptidique de la molécule de classe II. D’autre part, la fixation d’autres peptides pourrait être inhibée par un blocage allostérique exercé par CLIP. En fait, la structure cristallographique de CLIP associé à la molécule HLA-DR3 a révélé qu’il se fixe au niveau du sillon peptidique de façon quasiment identique aux peptides antigéniques.

La protéolyse de la séquence correspondant à CLIP permet de démasquer le site de liaison au peptide et supprime le signal de rétention dans les endosomes pour le dimère $\alpha\beta$, qui peut alors s’associer à un peptide antigénique. La dissociation entre la chaîne invariante et les molécules de classe II dépend d’une part de l’activité protéolytique des endosomes et d’autre part, de l’affinité de la chaîne invariante pour les différents allèles des molécules de classe II. L’étude de cellules B déficientes dans la présentation d’antigènes exogènes et mutées dans les gènes HLA-DM, situés dans la région des gènes des molécules de classe II, a suggéré un rôle primordial des molécules DM pour la liaison de peptides aux molécules de classe II. L’équivalent de ces molécules DM a également été identifié chez la souris et est appelé molécules H2-M. Des travaux ont montré que les protéines DM catalysent la dissociation de peptides déjà présents sur les molécules de classe II, dont CLIP, permettant l’échange de CLIP contre des peptides antigéniques [Kropshofer et al., 1996]. Ces résultats sont confir-

més par l'étude de souris n'exprimant plus les molécules H2-M par des mutations au niveau des gènes codant pour ces protéines. Les cellules spléniques de ces animaux expriment à leur surface, des molécules de classe II stables, auxquelles sont fixés surtout des peptides dérivés de la chaîne invariante, et ces cellules ne sont pas, ou peu, capables de présenter des protéines ou des peptides à des cellules T. De plus, l'activité des molécules HLA-DM est optimale dans un environnement acide (pH 5) correspondant au pH des vésicules tardives ou lysosomiales de la cellule, où sont générés les peptides antigéniques.

1.4.3 Compartiments cellulaires impliqués dans l'association des molécules de classe II au peptide antigénique

Les molécules de classe II associées à la chaîne invariante sont transportées depuis le réticulum endoplasmique, à travers le réseau golgien, vers la voie endocytyque. Cependant, il n'y a pas, à l'heure actuelle, de consensus sur la distribution et le trafic des complexes classe II-chaîne invariante parmi les différents compartiments de la voie endocytyque, que constituent schématiquement les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes [Castellino et al., 1997]. La liaison de peptides aux molécules de classe II a-t-elle lieu dans un compartiment unique, ou au contraire dans les différentes vésicules constituant la voie endocytyque ?

La notion d'un compartiment endocytyque spécialisé dans l'accumulation des molécules de classe II et où aurait lieu leur rencontre avec les peptides antigéniques a été initialement suggérée par une étude morphologique et immunocytochimique d'une lignée lymphoblastoïde B humaine. Les molécules de classe II ont été révélées dans un compartiment prélysosomal en absence de chaîne invariante, mais elles n'ont pas été détectées dans les endosomes précoces, suggérant un transport direct des molécules de classe II vers cette vésicule. Par ailleurs, les molécules de classe II ont été localisées dans les lysosomes et les phagolysosomes de macrophages ayant capté des bactéries *Listeria monocytogenes* par phagocytose. Les complexes peptide-classe II ont également été retrouvés au niveau de prélysosomes dans les macrophages.

Plus récemment, à l'aide de techniques de fractionnement subcellulaire des vésicules de la voie endocytyque, plusieurs études analysant des cellules B ont mis en évidence un compartiment endocytyque spécialisé, appelé CIIV (vésicule de classe II)

où sont retrouvées les molécules de classe II nouvellement synthétisées, associées de façon stable à des peptides antigéniques. Les molécules de classe II ayant perdu leur chaîne invariante dans les endosomes, seuls des peptides de la région CLIP provenant de la chaîne invariante ont été retrouvés associés aux molécules de classe II dans ces compartiments CIIV. L'association de peptides antigéniques aux molécules de classe II s'effectuerait dans ce compartiment, différent des endosomes précoces, tardifs ou lysosomaux, auquel, toutefois, les antigènes internalisés par endocytose auraient accès.

Au contraire de ce compartiment spécialisé dans la liaison peptide-classe II, une étude sur des lymphoblastes B spléniques de souris a révélé la présence de complexes classe II-chaîne invariante et de complexes classe II-peptide antigénique dans diverses catégories de vésicules de la voie endocytique. Cette étude suggère que la fixation du peptide aux molécules de classe II peut s'effectuer tout au long du cheminement des molécules de classe II depuis le réseau golgien dans la voie endocytique en fonction du niveau de dégradation des antigènes dans chaque compartiment [Castellino and Germain, 1995].

Chaque molécule du CMH ayant chargé efficacement un peptide antigénique quitte le compartiment où ce complexe s'est formé puis est transportée vers la membrane plasmique par un mécanisme d'exocytose, pour être reconnue par les lymphocytes T spécifiques.

1.4.4 Les cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène restreinte par les molécules de classe II

1.4.4.1 Les cellules dendritiques

Les sous-populations des DCs On connaît actuellement deux voies principales de différenciation des cellules en DCs. La voie myéloïde produit deux sous-populations : les cellules de Langerhans, qui se trouvent dans l'épithélium stratifié tel que la peau ; et les DCs interstitiels, qui se trouvent dans tous les autres tissus. La voie lymphoïde produit les DCs plasmacytoides (pDCs), qui sécrètent de grandes quantités d'IFNs de type I (IFN- α et IFN- β) après infection virale [Siegal et al., 1999].

Les DCs et leurs précurseurs montrent une plasticité fonctionnelle remarquable. Par exemple, les pDCs forment une de premières barrières à l'expansion des virus intrus par la sécrétion d'IFNs de type I, et participent donc à la réponse innée. Ensuite,

les cellules se différencient en DCs qui peuvent présenter des antigènes aux cellules T, fonctionnant de ce fait comme membres du système immunitaire adaptatif. Les monocytes peuvent se différencier soit en macrophages, qui fonctionnent comme éboueurs (*scavengers* en anglais), soit en DCs qui induisent les réponses immunes spécifiques. Les différentes cytokines biaisent la différenciation *in vitro* des monocytes en DCs avec des phénotypes et des fonctions différents. Après activation (par exemple : GM-CSF), les monocytes qui rencontrent l'IL-4 deviennent IL-4-DCs. En revanche, après rencontre avec IFN- α , TNF ou l'IL-15, les monocytes activés se différencient en IFN- α -DCs, TNF-DCs ou IL-15-DCs, respectivement. Chacune de ces sous-populations de DCs a des fonctions biologiques communes et d'autres uniques, qui sont déterminées par la combinaison de molécules de surface exprimées et de cytokines sécrétées. Par exemple, les TNF-DCs sont hétérogènes et incluent les cellules de Langerhans CD1a+ et les DCs interstitielles CD14+. *In vitro* les expériences ont prouvé que les cellules de Langerhans et les DCs interstitielles qui ont été générées en culture à des précurseurs haématopoïétiques CD34+ diffèrent dans leur capacité d'activer les lymphocytes : les DCs interstitielles induisent la différenciation des cellules B naïves en cellules de plasma d'immunoglobuline-sécrétion, tandis que les cellules de Langerhans semblent être en particulier activateurs efficaces des cellules T CD8+. Cependant cette vision est remise en question par certains travaux récents (voir les revus dans [Le Borgne et al., 2006]). Elles diffèrent également dans leurs modes de sécrétion des cytokine (seules les DCs interstitielles produisent de l'IL-10) et leurs activités enzymatiques, qui pourraient être importantes dans la sélection des peptides qui sont présentés aux cellules T. En effet, les différentes enzymes sont susceptibles de dégrader un antigène donné en différents peptides. Ceci mène alors à différents complexes peptide-HLA présentés et de ce fait à des répertoires distincts des cellules T spécifiques d'antigène. Ainsi, ces DCs uniques sont susceptibles de produire des effecteurs immuns uniques, permettant de ce fait la large réponse immune qui est exigée pour combattre les micro-organismes et les tumeurs de manière permanente [Banchereau and Palucka, 2005].

Maturation des DCs La fonction principale des DCs immatures est la capture d'antigènes, tandis que les DCs matures fonctionnent principalement en tant que cellules présentatrices d'antigènes. *In vivo*, la maturation de DCs est étroitement liée

à leur migration du tissu périphérique à l'organe lymphoïde secondaire. Il est associée à plusieurs événements coordonnés : la perte de récepteurs endocytiques et/ou phagocytaires ; l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation telles que CD40, CD58, CD80 et CD86, des changements de la morphologie ; la diminution dans les compartiments lysosomaux de CD68 à une l'augmentation de l'expression de LAMP3 (protéine lysosomal-associée 3 de membrane), et des modifications dans les compartiments des molécules HLA II. Dans un but thérapeutique, la méthode standard d'induire la maturation des DC avec un cocktail des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF, IL-6 et prostaglandine E2) [Jonuleit et al., 1997] doit être examinée parallèlement à d'autres stimulus. En effet, la combinaison d'IL-1 β et de TNF de type I et les IFNs de type II (IFN- α et IFN- γ , respectivement) semble produire des DCs plus efficace en termes de sécrétion d'IL-12 ce qui favoriserait l'induction de CTLs spécifiques de tumeur in vitro [Mailliard et al., 2004]. Ils favorisent également l'apparition de CCR7. Il sera donc important d'identifier dans les diverses sous-populations de DCs les stimulus qui déclenchent un programme désiré de maturation menant à l'induction de cellules T spécifique de tumeur sans induction des cellules TReg. Par exemple, les ligands du TLR (*Toll-like receptor*) pourraient être utilisés pour imiter les voies naturelles de maturation de DCs induites par les microbes. Ceci, avec le signal *T-cell-like* fourni par CD40, pourrait augmenter la fonction des DCs [e Sousa, 2001]. En effet, des signaux médiés par TLR sont impliqués dans le contrôle de l'activation des cellules T CD4+ [Pasare and Medzhitov, 2004]. Les TLRs sont exprimés différenciellement par les sous-populations distinctes de DC. Par exemple, TLR9 (un récepteur pour l'ADN deméthylé) est exprimé seulement par des pDCs, tandis que les DCs myéloïde expriment préférentiellement les TLR2 et TLR4 (récepteurs pour les produits bactériens peptidoglycan et LPS, respectivement) [Banchereau and Palucka, 2005]. Une telle expression différentielle pourrait conférer des signaux distincts de maturation, produisant des types distincts de réponses immunes.

La présentation d'antigènes par les DCs Après avoir capté un antigène, les DCs sont ensuite capables de migrer vers les zones T des organes lymphoïdes pour activer les cellules T spécifiques de l'antigène. Les cellules dendritiques sont impliquées aussi bien dans la présentation d'antigènes aux cellules T CD4+ restreintes par HLA II que dans l'induction de cellules cytotoxiques, restreintes par HLA I, notamment pour des

antigènes d'origine tumorale. L'excellente efficacité de présentation de l'antigène par les DCs est attribuée notamment au niveau d'expression élevé des molécules de HLA I et HLA II et de molécules de costimulation à leur surface. D'autre part, elles sont capables d'internaliser des antigènes par différentes voies efficaces d'endocytose, telles que la pinocytose en phase liquide, l'endocytose médiée par des récepteurs tels que le RFc ou le récepteur mannose. Leur capacité à phagocyter des antigènes particuliers reste assez controversée, et ceci pourrait s'expliquer par la très grande hétérogénéité morphologique et fonctionnelle de ces cellules en fonction de leur état de différenciation, en particulier après les multiples étapes nécessaires à leur isolement et leur culture *in vitro*. Ainsi, rapidement après leur isolement de la peau, les cellules de Langerhans sont capables de phagocyter des levures, des bactéries ou des particules de latex de 0,5 à 3 μ m. Cependant, cette activité phagocytaire est fortement diminuée au cours de la maturation des cellules *in vitro*, tandis qu'elles acquièrent des propriétés de costimulation importantes. Par ailleurs, des précurseurs de cellules dendritiques issus de la moelle osseuse phagocytent des bactéries comme le BCG ou des particules de latex de 2 μ m alors que des DCs provenant du thymus ou du sang périphérique humain sont incapables de phagocyter des microorganismes tels que le BCG, *Candida albicans* ou des particules de latex. La capacité de capture de l'antigène semble également régulée par les cytokines employées *in vitro* pour la culture des cellules dendritiques. En effet, la culture de cellules mononucléées humaines CD14⁺, CD19, CD2, provenant du sang périphérique, en présence de GM-CSF et d'IL4 leur confère la capacité d'internaliser des substances exogènes par un processus de macropinocytose. Toutefois, la rencontre avec un antigène engendre (pas forcément) une maturation des DCs conduisant à la diminution de leur capacité à capter des antigènes, au profit d'une meilleure aptitude à présenter des antigènes.

1.4.4.2 Les macrophages

Les monocytes originaires de la moelle osseuse sont immatures, ils circulent dans le sang, d'où ils peuvent migrer vers les organes et tissus de l'organisme, où ils deviennent alors des macrophages différenciés. Ces macrophages sont distribués dans tout l'organisme, comme le foie (appelés alors cellules de Kupfer), la rate, les ganglions lymphatiques, le cerveau, les poumons, les cavités séreuses (pleurale et péri-

tonéale), le tractus gastro-intestinal, etc. Ils expriment de façon constitutive les molécules de classe II du CMH et possèdent une activité phagocytaire très importante qui leur permet d'ingérer des micro-organismes ou des débris cellulaires. L'efficacité d'internalisation de substances antigéniques peut être modulée par le ciblage d'antigènes vers des récepteurs présents à la surface des macrophages, qui permettent par conséquent d'accroître l'efficacité de présentation de déterminants antigéniques. Parmi ces nombreux récepteurs, nous pouvons citer les récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines G (RFcg), les récepteurs de polysaccharides (par exemple, le mannose) reconnaissant les glycoprotéines des agents microbiens et les récepteurs pour les protéines de la famille des α 2-macroglobulines ayant la propriété de fixer de façon covalente d'autres protéines lors de changement conformationnel induit par des enzymes, comme les récepteurs pour les fragments C3 ou C4 du complément.

Il existe plusieurs types de RFcg, dits de haute ou de faible affinité. Les récepteurs de haute affinité, RFcgI, ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans l'internalisation de l'antigène sous forme de complexes immuns antigène-anticorps, au contraire des récepteurs de faible affinité RFcgII et RFcgIII. Toutefois, il faut distinguer l'isotype RFcgIIb2, exprimé par les monocytes et macrophages de l'isotype RFcgIIb1, exprimé par les lymphocytes B et ne permettant pas la présentation d'antigène aux lymphocytes T. La capture de complexes immuns par l'intermédiaire de RFc permet notamment la présentation d'un antigène complexe par sa structure quaternaire, l'hormone chorionique gonadotrope (hCG), à des cellules T spécifiques.

1.4.4.3 Les Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont assez peu efficaces pour la capture d'antigènes par micro pinocytose en phase liquide. Cependant, les cellules B peuvent fixer les antigènes grâce à leurs immunoglobulines de surface (IgM). La spécificité de l'IgM pour un antigène donné permet de concentrer cet antigène et de le présenter aux cellules T à des doses 1000 fois inférieures à celles nécessaires pour activer les lymphocytes T avec des cellules B non-spécifiques de l'antigène. Les IgM sont continuellement internalisées, qu'elles soient liées ou non à un antigène. Lorsqu'une IgM fixe l'antigène qui lui est spécifique en surface du lymphocyte B, elle permet le transport de cet antigène vers les compartiments endosomaux et lysosomaux de la cellule B où l'antigène est

dégradé en fragments peptidiques présentés aux cellules T auxiliaires. Ce processus est essentiel pour l'interaction entre les cellules T et B conduisant à l'activation et à la différenciation des cellules B en cellules productrices d'anticorps.

1.5 Les molécules HLA-DP

Compte tenu de la place privilégiée que tient la molécule HLA-DP4 dans mes travaux, j'ai détaillé dans cette partie les caractéristiques des molécules HLA-DP.

En 1980, Shaws et al publient la découverte de cinq nouveaux antigènes d'histocompatibilité codés par la région HLA-D et exprimés à la surface de cellules lymphocytaires B : ils les désignent par le nom SB pour *secondary B cells (SB) antigens* [Shaw and Johnson, 1980]. Entre 1980 et 1984, de nombreux résultats viennent se greffer à la découverte des molécules SB. Il en ressort que ces dernières correspondent à une nouvelle série allélique de la région HLA-D.

Il a été difficile de se produire les réactifs sérologiques spécifiques pour les molécules SB et ces molécules semblent également produire une faible réponse dans la réaction mixte lymphocytaire (MLR) [Termijtelen et al., 1984]. En conséquence, les deux méthodes instrumentales dans la caractérisation initiale du polymorphisme dans les régions DR et le DQ se sont révélées peu efficaces pour caractériser les molécules SB. Par contre, ces molécules stimulent une réponse secondaire forte dans les tests dits de primed lymphocytes T spécifiques [Mawas et al., 1980, Shaw and Johnson, 1980], et en conséquence cette méthode, connue sous le nom de PLT (primed lymphocyte test), est devenue la méthode standard de typage de SB.

C'est lors du 9ème atelier international d'histocompatibilité dirigé par E. Albert et W. Mayr en 1984 qu'une vue synthétique de l'ensemble des gènes du CMH et de leurs produits a pu émerger. On connaît dès lors la séquence en acides aminés de la chaîne lourde des antigènes de classe I (HLA-A, B, C) et des chaînes lourdes et légères des antigènes de classe II (DR, DQ, DP). La nouvelle nomenclature WHO renomme les molécules SB : elles portent depuis le nom de DP.

Le rôle des molécules HLA-DP dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T est aujourd'hui bien documenté. Ces molécules sont exprimées à la surface des APC et stimulent les cellules T. Bien que les déterminants de restriction des cellules T spécifiques d'un antigène soit majoritairement restreints aux molécules HLA-DR, et

malgré une faible expression des molécules HLA-DP à la membrane des cellules, elles induisent des réponses T spécifiques des peptides antigéniques qu'elles présentent.

1.5.1 Organisation de la région génomique HLA-DP

La région génomique HLA-DP est localisée sur le bras court du chromosome 6, dans la partie centromérique de la région HLA-II ou HLA-D. Elle contient environ 70 kb et 4 gènes (Fig. 1.10) : DPB2, DPA2, DPB1 et DPA1, dans cet ordre du centromère vers le télomère. Au contraire des autres locus HLA-II (DR et DQ), les gènes DP de chaque paire sont orientés en tête-bêche. Les gènes DPB2 et DPA2 sont des pseudogènes ; les gènes DPA1 et DPB1 codent respectivement pour les chaînes α et β qui s'assemblent pour former la molécule HLA-DP exprimée à la surface des cellules [Okada et al., 1985]. Les deux gènes exprimés sont polymorphes et pour le gène HLA-DPB1 les variations sont concentrées dans six régions hypervariables (A, B, C, D, E et F) de l'exon 2 codant pour la chaîne β 1. Chaque allèle HLA-DPB1 est caractérisé par une combinaison spécifique des séquences de ces 6 régions hypervariables [Bugawan et al., 1990]. On décompte aujourd'hui 20 allèles DPA1 et 107 allèles DPB1 (site immunogenetics)

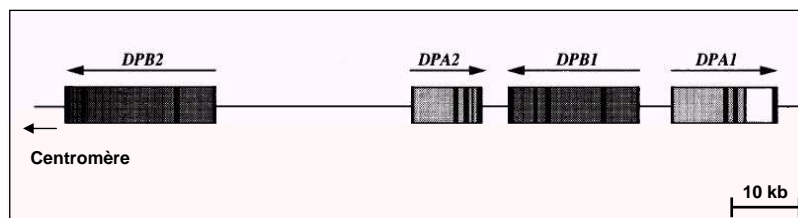


FIG. 1.10: Organisation des gènes DP du locus HLA-D.

Les gènes DP, contrairement à ceux des autres séries DR et DQ, voient leurs couples de gènes DPA et DPB orienté en miroir avec un sens de transcription (indiqué par les flèches) opposé.

1.5.2 Structure, polymorphisme, et fréquences géniques de HLA-DP

Il n'existe aucun cristal des molécules HLA-DP actuellement. Toutefois, il est possible de déduire leur structure par analogie de séquence à partir des cristaux HLA-DR existants. Ainsi, il y a déjà deux modèles de complexe de HLA-DP publiés :

celui de la molécule HLA-DPA1*0103/DPB1*0201 complexée avec le peptide YAAS-SYLSL dérivé de la chaîne lambda d'immunoglobuline humaine [Reche and Reinherz, 2003] (Fig. 1.11); et celui de la molécule HLA-DPA1*0103/DPB1*0401 complexée avec le peptide Oxy271-287 [Castelli et al., 2002] (Fig. 1.12). Les protéines HLA-DP possèdent leurs propres caractéristiques de liaison qui sont différentes de celles de HLA-DR, même si elles suivent des principes similaires. Les résidus polymorphes des chaînes α et β des molécules HLA-DP les plus représentées dans la population caucasienne sont regroupés dans Tab. 1.6. Les résidus polymorphes impliqués dans le site de liaison du peptide sont principalement portés par la chaîne β . Cette dernière joue un rôle primordial dans la liaison des peptides, celui de la chaîne α étant restreint à l'effet d'un seul résidu ($\alpha 31$) [Gaston et al., 1997].

Le numéro des poches dans lesquelles chaque résidu est impliqué a été déduit de la comparaison de séquence avec les molécules HLA-DR déjà cristallisées. Dix positions polymorphes semblent participer directement à l'architecture des poches qui accommodent les chaînes latérales du peptide ligand et en déterminent les caractéristiques physico-chimiques. Ainsi, la taille de la poche P1 est sous le contrôle du résidu dimorphique $\beta 86$ (glycine/aspartate). On peut donc s'attendre à ce que les molécules possédant une glycine à cette position acceptent dans leur poche 1 de gros résidus aromatiques (DP2 et DP4), contrairement à celles pourvues d'un aspartate (DP9) qui y accommoderaient des résidus basiques.

La chaîne latérale du résidu polymorphe $\beta 11$ est, quant à elle, impliquée dans le contrôle de la taille et de la polarité de la poche 6. Comme indiqué dans Tab. 1.6 il s'agit soit d'une glycine soit d'une leucine. Selon le résidu qu'elle possédera à cette position la molécule accommodera soit un gros résidu hydrophobe en présence d'une glycine (DP4) soit un acide aminé hydrophobe de petite taille si la poche est encombrée par la chaîne latérale de la leucine (DP9).

Les fréquences géniques des différents allèles HLA-DPB1 dans différentes populations sont présentées dans Tab. 1.7 (chiffres tirés de l'article de [Begovich et al., 2001]). Toutes populations confondues, Pour 12 des 18 groupes ethniques présentés, les allèles DP4 sont prédominants (soit HLA-DPB1*0401 soit -*0402). Ces molécules recouvrent à elles deux de 44 à 80% des individus de la population caucasienne. Dans les pays d'Afrique, ces deux molécules sont largement représentées même si elles ne sont pas toujours majoritaires. Dans un travail antérieur du laboratoire, Castelli et

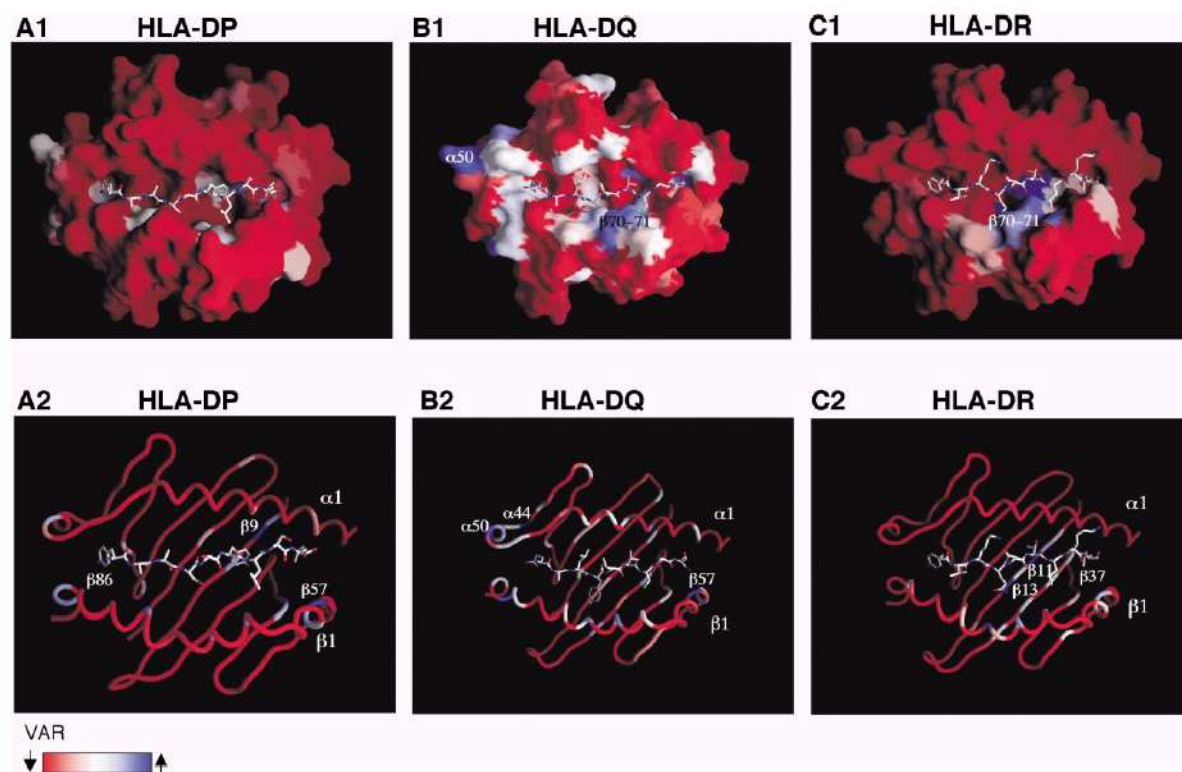


FIG. 1.11: Comparaison de la variabilité de séquence dans les domaines $\alpha 1/\beta 1$ des molécules HLA II.

La variabilité est représentée selon une échelle à deux couleurs, bleu et rouge. Le rouge indique les régions non-variables et en bleu ressortent les régions variables. Les structures DQ et DR sont issues des structures publiées dans la PDB, 1JK8 et 1HXY respectivement (cf. Tab. 1.3). Aucune structure tridimensionnelle de protéines HLA-DP n'a encore été publiée. Les auteurs se sont donc basés sur la séquence des molécules DP et ont prédit cette structure en fonction des connaissances structurales des autres séries. Pour simplifier, seul le cœur du peptide (9 acides aminés) fixé dans le sillon des molécules est montré.

| POSITIONS POLYMORPHES | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|-----|
| chaîne β | | | | | | | | | | | | | | | | chaîne α | | | |
| ALLELES | FREQ.(%) | 8 | 9 | 11 | 37 | 38 | 57 | 58 | 59 | 67 | 71 | 78 | 86 | 87 | 88 | 89 | 31 | 50 | 83 |
| | | (-) | (9) | (6) | (9) | (9) | (9) | (-) | (-) | (7) | (4,7)(4) | (1) | (-) | (-) | (1) | | (1) | (-) | (-) |
| chaîne β | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 401 | 40.1 | L | F | G | F | A | A | A | E | I | K | M | G | G | P | M | | | |
| 402 | 11.0 | - | - | - | - | V | D | E | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| 201 | 11.9 | - | - | - | - | V | D | E | - | - | E | - | - | - | - | - | | | |
| 501 | 1.3 | - | - | - | L | V | E | - | - | - | - | - | D | - | - | - | | | |
| 101 | 7.1 | V | Y | - | Y | - | - | - | - | - | - | V | D | E | A | V | | | |
| 301 | 9.1 | V | Y | L | - | V | D | E | D | L | - | V | D | E | A | V | | | |
| 901 | 1.1 | V | H | L | - | V | D | E | D | - | E | V | D | E | A | V | | | |
| chaîne α | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 103 | 78.2 | | | | | | | | | | | | | | | | M | Q | T |
| 201 | 21.2 | | | | | | | | | | | | | | | | Q | R | A |

Les fréquences alléliques (Freq) sont celles de la population française. Les positions sont numérotées sur la base des séquences HLA-DR utilisées par Stern et al. (Stern et al, 1994). Comme les résidus 23 et 24 sont absents des séquences DPB, les résidus de la position 37 à la fin correspondent respectivement aux positions 35, 36, 55, 56, 57, 65, 69, 76, 84, 85, 86 et 87 dans la séquence DPB. Les nombres entre parenthèse spécifient le numéro de la poche concernée

TAB. 1.6: Résidus polymorphes des chaînes α et β des molécules HLA-DP

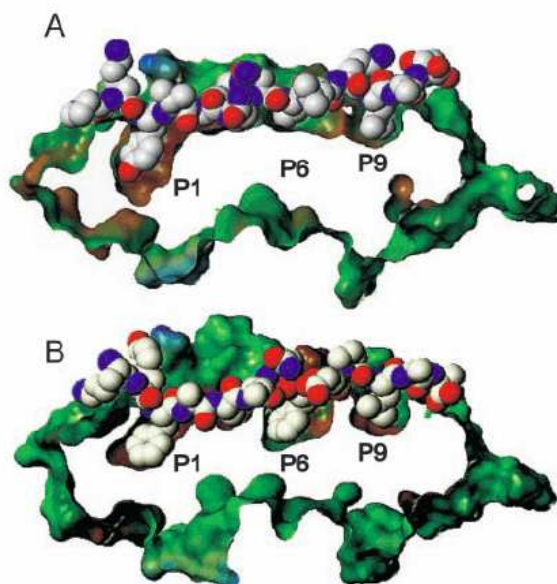


FIG. 1.12: Poches de spécificité de HLA-DR1/HA (A) et Complexes de HLA-DP4/d'Oxy (B).

Les vues de côté des molécules de HLA montrent la disparité de taille des poches. Les molécules extérieures de HLA sont en vert et brun pour représenter des zones hydrophiles ou hydrophobes, respectivement. Les atomes des peptides sont présentés : C en blanc, O en rouge, et N en bleu.

al. [Castelli et al., 2002] ont déterminé leur motif de liaison (voir dessous).

1.5.3 Liaison des peptides aux molécules HLA-DP

Les motifs de liaison de peptides aux molécules HLA-DP9 (DPA1*0201/DPB1*0901) [Dong et al., 1995], HLA-DP2 (DPA1*0103/DPB1*0201) [Chicz et al., 1997], et HLA-DP4 (DPA1*0103 / DPB1*0401, DPA1*0103/DPB1*0402) [Castelli et al., 2002] (Tab. 1.8) ont été bien décrits et ils correspondent à ce qui était attendu compte tenu de la nature physico-chimique des poches modélisées.

Comme montré dans la Tab. 1.8, les poches 1 et 6 semblent être les plus impliquées dans la liaison des peptides. P1 et P6 ne contiennent que deux positions polymorphes $\beta 86$ et $\beta 11$ qui sont dimorphiques : $\beta 86$ est soit une glycine soit un aspartate ; $\beta 11$ est soit une glycine soit une leucine. En conséquence, les acides aminés interagissant dans les poches 1 et 6 sont contrôlés par des combinaisons limitées d'acide aminé. Les deux molécules HLA-DP4 ne diffèrent que par trois acides aminés qui résident dans la poche 9 mais qui n'influence pas la sélection de l'acide aminé dans la chaîne

| ALLELES | POPULATIONS CAUCASIENNES | | | | | | | POPULATIONS NOIRES | | | | | POPULATIONS ASIATIQUES | | | | | |
|---|--------------------------|------|------|------|------|------|------|--------------------|------|------|------|------|------------------------|------|------|------|------|------|
| | FRA | GER | ITA | SPA | GIT | CUS | CAN | SEN | NSD | BUS | HOT | NUS | HNG | JAP | KOR | BUY | SIN | TLI |
| DPB1*0101 | 7.1 | 2.2 | 4.6 | 6.1 | - | 3.2 | 7.6 | 18.2 | 29.7 | 28.2 | 16.3 | 27.7 | 1.8 | 0.1 | - | - | - | - |
| DPB1*0201 | 11.9 | 8.5 | 13.2 | 15.9 | 19.2 | 9.8 | 9.8 | 13.8 | 11.9 | 5.2 | 14.3 | 12.9 | 21.0 | 20.6 | 17.5 | 8.3 | 13.4 | - |
| DPB1*0202 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 2.8 | 2.1 | 1.8 | 1.6 | - | - | - | - | 0.4 | - | 4.5 | 9.9 | 17.4 | 8.3 | - |
| DPB1*0301 | 9.1 | 12.4 | 11.3 | 8.0 | 5.0 | 7.4 | 9.5 | 3.8 | 5.1 | 1.7 | 5.6 | 3.3 | 7.0 | 3.0 | - | 4.2 | 3.5 | 3.0 |
| DPB1*0401 | 40.1 | 38.1 | 34.8 | 32.6 | 32.1 | 25.1 | 41.1 | 4.8 | 9.9 | 18.7 | 11.5 | 11.0 | 45.3 | 4.7 | 11.4 | 1.4 | 6.9 | 33.0 |
| DPB1*0402 | 11.0 | 15.4 | 15.5 | 8.7 | 13.0 | 12.6 | 12.0 | 25.5 | 17.9 | 11.7 | 27.4 | 9.0 | 3.5 | 8.9 | 8.8 | 1.4 | 3.5 | 61.0 |
| DPB1*0501 | 1.3 | 1.7 | 2.0 | 1.5 | 0.7 | 1.2 | 3.9 | - | 1.1 | - | 0.5 | 0.8 | 15.1 | 38.6 | 25.8 | 52.1 | 48.1 | 3.0 |
| DPB1*0601 | 2.9 | 1.7 | 3.1 | 4.1 | 2.8 | 5.6 | 1.3 | 1.9 | 0.6 | - | - | 1.7 | 0.4 | 1.8 | 1.5 | - | 0.7 | - |
| DPB1*0801 | 0.2 | - | 0.5 | 0.6 | - | - | 0.3 | - | - | - | - | - | - | 0.1 | - | - | - | - |
| DPB1*0901 | 1.1 | - | 1.3 | 1.6 | - | 0.3 | - | - | - | 0.8 | - | 0.4 | - | 8.5 | 2.0 | - | - | - |
| DPB1*1001 | 2.2 | 1.7 | 3.3 | 0.9 | - | 1.8 | 1.6 | - | 1.1 | - | - | - | - | 0.1 | - | - | - | - |
| DPB1*1101 | 2.6 | - | 1.8 | 4.6 | - | 0.3 | 2.2 | 1.0 | 2.8 | 0.9 | 6.0 | 3.6 | - | - | 0.5 | - | 0.7 | - |
| DPB1*1301 | 1.8 | 3.4 | 2.0 | 1.6 | 5.9 | 2.1 | 2.4 | 9.6 | 6.8 | - | 0.5 | 4.0 | 0.4 | 2.9 | 8.8 | 13.2 | 9.0 | - |
| DPB1*1401 | 1.1 | 0.6 | 2.8 | 1.5 | - | 1.8 | 2.2 | 1.9 | 1.1 | 0.8 | 1.6 | - | 2.5 | 1.7 | 3.0 | 1.4 | 1.4 | - |
| DPB1*1501 | 1.1 | 1.1 | 0.5 | 0.3 | - | 0.3 | 0.8 | - | 1.1 | 0.8 | 1.6 | - | - | - | - | - | - | - |
| DPB1*1601 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.6 | - | 0.6 | 0.3 | - | - | - | - | 1.2 | 0.4 | 0.4 | 4.5 | - | 1.4 | - |
| DPB1*1701 | 0.7 | 1.1 | 1.3 | 1.9 | - | 2.3 | 0.5 | 18.2 | - | - | - | 9.0 | - | 0.2 | - | - | 1.4 | - |
| DPB1*1801 | - | - | - | 0.3 | - | 1.2 | 0.6 | - | 5.1 | - | 0.6 | 6.5 | - | - | - | - | - | - |
| DPB1*1901 | 0.2 | 1.1 | 0.5 | - | 0.7 | 0.6 | 0.8 | - | 0.6 | - | - | 0.4 | - | 0.1 | 1.5 | 0.7 | 0.7 | - |
| Blk | 4.5 | 9.7 | - | 6.5 | 18.5 | 22.0 | 1.5 | 1.3 | 4.9 | 31.0 | 14.0 | 8.3 | 2.7 | 3.7 | 4.6 | - | 0.9 | - |
| Valeurs tirées de Colombari, 1993) Les populations caucasiennes sont : FRA, Français; GER, Allemands; ITA, Italiens; SPA, Espagnols; GIT, Gitans d'Espagne; | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(Valeurs tirées de Colombani, 1993) Les populations caucasiennes sont : FRA, Français ; GER, Allemands ; ITA, Italiens ; SPA, Espagnols ; GIT, Gitanos d'Espagne ;

CUS, Caucasiens des Etats-Unis d'Amérique ; CAN, Canadiens. Les populations noires sont : SEN, Sénégalais ; NSD, noirs du sud de l'Afrique ; BUS, Bushman ; HOT,

Hottentots ; NUS, Noirs des Etats-Unis d'Amérique ; HNG, Hinghlanders de Nouvelle-Guinée. Les populations asiatiques sont : JAP, Japonais ; KOR, Coréens ; BUY,

population Buyi de Chine du sud ; SIN, Chinois de Singapour ; TLI, Tlingit, Indiens d'Amérique du Nord (côte Nord du Pacifique). Blk : fréquence d'allèle non détectée

(Blank). Les fréquences ont été déterminées à partir de typages par biologie moléculaire selon les recommandations du 11^e IHWS.

TAB. 1.7: Fréquences géniques (en %) de différents allèles HLA-DPB1

latérale qui se fixe dans cette poche. Par conséquent, ces deux molécules partagent un motif de liaison très similaire. HLA-DPB1*0201 et HLA-DPB1*0402 ne diffèrent que par un acide aminé dans la poche 4, ce qui n'influence pas le motif contrôlé par les poches 1 et 6. Ces molécules devraient avoir un répertoire de peptides largement partagé et former un supertype de molécules de HLA II comme suggéré par Castelli et al. [Castelli et al., 2002]. Par contre, HLA-DP9 appartient à un autre supertype parce qu'un résidu positivement chargé et un petit résidu hydrophobe servent de résidu d'ancrage dans les poches P1 et P6. En conséquence, Castelli et al. proposent que les molécules HLA-DP sont distribuées en trois supertypes majeurs définis par trois combinaison d'acide aminé : $\beta G11 \beta G86$, $\beta G11 \beta D86$, et $\beta L11 \beta D86$ [Castelli et al., 2002].

1.5.4 Fonction de HLA-DP

1.5.4.1 HLA-DP et la transplantation

La transplantation de moelle osseuse d'un frère ou d'une soeur génotypiquement identique a été utilisée avec succès pour traiter des patients atteints de leucémie ou d'une grande variété de désordres congénitaux de lymphohémotopoïèse [Sullivan et al., 1989]. Cependant, moins de 40% de patients éligibles ont un frère ou une soeur de HLA-identique. Des donneurs sans lien de parenté mais phénotypiquement assortis ou partiellement assortis sont devenus un traitement alternatif pour les patients qui n'ont pas un frère ou une soeur génotypiquement identique. Malheureusement, les taux de la maladie aiguë de GVH aiguë sont significativement plus importants après la transplantation chez ces receveurs par rapport aux receveurs qui ont reçu la moelle osseuse d'un frère ou d'une soeur. Il semble que des disparités HLA-DP et HLA I silencieuse sérologiquement pourraient expliquer, au moins en partie ces GVH [Hows et al., 1986, Ash et al., 1990, Mcglave et al., 1990].

La compatibilité HLA-DP entre donneur et receveur n'était initialement pas inclus dans le processus de sélection de donneurs sans lien de parenté. C'était à cause de la technique de typage de HLA-DP (PLT) qui exigeait des réactifs difficilement disponibles et n'était pas assez performante pour détecter tous les polymorphismes [Petersdorf et al., 1993]. Plus tard, des techniques de séquençage ainsi que la technique SSOP (sequence-specific oligonucleotide probe) ont permis d'étudier le rôle des allèles

| (A) DP2 : β 86G β 11G [Chicz et al., 1997] | | | | |
|--|-----------|------------------|--|--------|
| Source protein | Residue | P _{ion} | Peptide sequence | Length |
| Ig λ | | | 1 2345 6 789 | |
| | 44-59 | 1992 | DTLR S Y A DW Y Q K PG | 16 |
| | 188-204 | 937 | Q S NN K Y A ASS Y LSLTPE | 17 |
| | 189-205 | 1857 | S NN K Y A ASS Y LSLTPEQ | 17 |
| | 189-204 | 874 | S NN K Y A ASS Y LSLTPE | 16 |
| Apolipoprotein A-II | 190-204 | 1659 | NN K Y AASS Y LSLTPE | 15 |
| | 12-27 | 1834 | LQ S LV S Q Y FQTVADYA | 16 |
| | 12-26 | | LQ S LV S Q Y FQTVADY | 15 |
| Interferon-induced protein 1-8D | 53-65 | 1528 | VPDH V W S L F N T L | 13 |
| Cathepsin S | 182-197 | 1780 | GG F MT T A F QY I D N K G | 16 |
| LR11 mosaic protein | 1869-1885 | 2041 | VYGI F Y A T S FLDLYRNP | 16 |
| HLA-DP α -chain | 37-46 | 1285 | D KK E T V W H L E | 10 |
| HLA-DP β -chain | 40-52 | 1081 | SDV G E F R A V T EL G | 13 |

| (B) DP4 : β 86G β 11G [Castelli et al., 2002] | | | | | | | | |
|---|-------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-----|----------------------------|-------------------|
| Résidus | DP401 | | | | DP402 | | | |
| | P1 | P4 | P6 | P9 | P1 | P4 | P6 | P9 |
| Favorable | F Y | FY | F Y W | F Y | F Y | FY | F Y W | F |
| | L | L | L | LVM | L | L | L | LVM |
| | | STA | | D | A | STA | | N |
| | | N | | | | N | | |
| | | ED | | A | | ED | | E D |
| Non-favorable | T A | K R | TA | N | T | | TA | Y |
| | N | | N | E | N | | N | KR |
| | E | | E | KR | E | | E | |
| | K | | K | | K | | K | |

| (C) DP9 : β 86D β 11L [Dong et al., 1995] | | | |
|---|----------|---|----------|
| Peptide | Position | Sequence | |
| | | 1 | 6 |
| MP-10R11 | 118-128 | G R EVHA A DL L R | |
| MP-10D13 | 113-125 | K DIQ F G R EVHA A D | |
| MP-35Q12 | 431-442 | K LEAE A KALKEQ | |
| MP-35A18 | 421-438 | T E K E K AELQAKLEAE A K A | |
| MP-36L12 | 442-453 | QLA K QAEEL A KL | |

Les résidus des molécules HLA localisés dans les poches 1 (β 86) et 6 (β 11) sont indiqués pour chacune des trois molécules HLA-DP. Les acides aminés des peptides ligands impliqués dans ces deux poches sont encadrés en rouge. DP2 et DP4, qui possèdent les mêmes acides aminés en β 86 et en β 11 ont des motifs de liaison très proches à l'inverse de DP9 qui a des résidus de nature différente à ces deux positions. Ces observations soulignent l'importance des poches 1 et 6 dans la liaison des peptides aux molécules HLA-DP et l'existence de supertypes de liaison regroupant plusieurs allèles DP partageant une large part de leur répertoire de peptides ligands.

TAB. 1.8: motif de liaison des molécules HLA-DP2, DP4 et DP9 décrits

de HLA-DP, en particulier dans la survenue de la GVH aiguë.

Au début des années 1990, des études cliniques directes avaient conduit à conclure que les molécules HLA-DP ne contribuaient pas au succès ou à l'échec d'une transplantation et par conséquent qu'une incompatibilité DP ne devrait pas être un critère d'exclusion du donneur dans le cadre d'une greffe de moelle osseuse [Middleton et al., 1992, Petersdorf et al., 1993, Moreau and Cesbron, 1994]. En 1999, cette vue a été mise en défaut par l'observation que l'assortiment de HLA-DP β mais pas de HLA-DP α était corrélé avec un moindre risque de GVH et la survie de patients apparemment à différents patients cohorts [Varney et al., 1999]. En concordance avec ceci, les cellules T CD4⁺ HLA-DP β spécifiques ont été isolées de la peau des patients développant une GVH aiguë [Gaschet et al., 1993, Gaschet et al., 1996a, Gaschet et al., 1998].

Dans le cas de rejet de greffe, des études ont apporté les preuves de l'existence d'un rôle non négligeable des molécules HLA-DP dans le développement d'un rejet de greffe en cas d'incompatibilité donneur/receveur et de l'aggravation de ce rejet si cette incompatibilité porte sur les deux allèles DPB1 plutôt que sur un seul [Shaw et al., 2003, Petersdorf et al., 2001, Laux et al., 2003]. Shaw et al. ont ainsi observé que les risques de rejet après transplantation de cellules souches hématopoïétiques étaient augmentés de presque 20% en cas d'incompatibilité HLA-DP [Shaw et al., 2003].

En concordance avec les observations ci-dessus, des études de la réponse cellulaire observée chez des patients développant le rejet de greffe confirment l'existence chez le receveur d'une réponse T cytotoxique spécifique dirigée contre les molécules HLA-DP des cellules du greffon [Gaschet et al., 1996b]. Toutefois, dans ces études d'autres incompatibilités HLA I et II étaient présentes en plus de DP. Des réponses induites contre ces antigènes différents ont donc pu contribuer à l'initiation de la réponse contre DP. Dans l'étude de Fleischhauer et al., ces auteurs ont étudié la réponse développée en cas de rejet chez le receveur ne diffère avec le donneur qu'au niveau de HLA-DP β 1*0901 avec le donneur. Les lymphocytes T circulants du patient au moment du rejet ont montré ex vivo une activité cytotoxique dirigée contre les cellules B lymphoblastoïde du donneur, et contre d'autres cibles exprimant HLA-DP β 1*0901. De plus, les auteurs ont obtenu des lignées T CD4⁺ spécifiques de HLA-DP β 1*0901 par restimulation in vitro non spécifique [Fleischhauer et al., 2001].

Néanmoins, il est aujourd'hui établi que la réponse alloréactive dirigée contre les

molécules HLA n'est pas le seul facteur responsable de GVH puisqu'on observe entre 20 à 50% de rejet de greffe malgré un génotype HLA identique avec le greffon [Ferrara and Deeg, 1991]. De plus, la contribution des antigènes mineurs d'histocompatibilité dans les rejets de greffe est aujourd'hui bien démontrée [Perreault et al., 1998]. Il est donc difficile d'être certain que la seule différence entre les molécules HLA-DP décrite dans les études plus hautes soit responsable du rejet. Toutefois, l'importance de la réponse dirigée contre ces protéines peut laisser supposer que leur rôle n'est pas négligeable.

1.5.4.2 HLA-DP et la présentation d'antigène

Comme les autres molécules de HLA II, la fonction biologique de HLA-DP est de présenter des peptides antigéniques exogènes aux lymphocytes T CD4+. Pour la première fois en 1983 Eckels et al décrivent une présentation de peptides issus d'antigènes des virus influenza et herpes simplex aux cellules T restreinte aux molécules HLA-DPw2 [Eckels et al., 1983]. En 1985, Austin et al confirment ce résultat en transfectant les gènes DPw2 dans des fibroblastes de souris et en montrant (1) que les cellules expriment les protéines présentatrices à leur surface et (2) qu'elles sont fonctionnelles car capables d'induire la prolifération spécifique du clone obtenu par Eckels et al en 1983 [Austin et al., 1985].

Depuis, des réponses dirigées contre des antigènes bactériennes, viraux, parasitaires, tumoraux ou contre des allergènes ont été bien décrites démontrant la fonctionnalité des molécules HLA-DP et leur implication dans la réponse immunitaire normale.

Réponses antibactériennes Agrewala et al ont isolé à partir des PBMC d'un patient atteint de tuberculose - 10 clones T CD4+ dirigés contre la protéine de choc thermique de 16KDa de *Mycobacterium tuberculosis*. Ils ont montré que deux d'entre eux étaient restreints à HLA-DP [Agrewala and Wilkinson, 1998]. Une réponse T restreinte à la molécule HLA-DP9 (DPA1*0201/DPB1*0901) et dirigée contre la protéine bactérienne antigénique M est décrite chez des patients infectés par des streptocoques A de sérotype 12 [Dong et al., 1995]. A partir des cellules mononucléaires du liquide synovial d'un patient infecté par *Chlamydia trachomatis*, Hermann et al ont isolés 76 clones T CD4+ dont 7 étaient spécifiquement dirigés contre la bactérie avec une

restriction HLA-DP [Hermann et al., 1992].

Réponses antivirales Plusieurs clones T CD4⁺ spécifiques d'antigènes viraux et restreints aux molécules HLA-DP ont été isolés par des équipes indépendantes. Ils s'agit par exemple de lymphocytes T CD4⁺ de patients immunisés contre le VHB qui reconnaissent le peptide immunodominant de l'antigène de surface HbsAg présenté par des fibroblastes de souris exprimant HLA-DPw4 [Celis and Karr, 1989]. Voo et al ont généré in vitro, à partir de PBMC de donneurs sains, des lignées T CD4⁺ spécifiques de l'antigène EBNA1 d'EBV et mis en évidence une réponse restreinte à la molécule HLA-DP3 [Voo et al., 2002]. Koelle et al ont isolé deux clones T CD4⁺ spécifiques de HSV-1 et restreints respectivement à HLA-DP401 et HLA-DP402, à partir de cellules mononuclées de cornées de patients atteints d'herpes oculaire [Koelle et al., 2000]. Des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques et restreints à HLA-DP ont été isolés dans d'autres contextes d'infection virale comme les virus de la vaccine [Littau et al., 1992], de la dengue (HLA-DP2, DP3, DP4) [Okamoto et al., 1998, Green et al., 1993] ou de la rage (HLA-DP4) [Celis et al., 1988]. Plus récemment Cohen et al ont identifié des peptides restreints à HLA-DP4 dans le genome du VIH [Cohen et al., 2006].

Réponse antitumorale Ces dernières années, des réponses T CD4⁺ spécifiques restreintes aux molécules HLA-DP ont été décrits pour plusieurs antigènes tumoraux associés à différents types de cancers. Il s'agit par exemple des antigènes NY-ESO1 [Zeng et al., 2001, Gnjjatic et al., 1988] et MAGE-A3 [Schultz et al., 2000, Schuler-thurner et al., 2002] qui appartiennent à la famille des antigènes cancer-testis et qui sont exprimés par plusieurs types de cellules cancéreuses (mélanome, cancer des poumons, de l'œsophage, etc.); ou encore de l'antigène tumoral p21-ras [Fossum et al., 1993, Abrams et al., 1997]; et pour finir van de Corput et al ont mis en évidence une réponse antitumorale DP restreinte dans le cadre de lymphomes B [van de Corput et al., 1997].

Autres réponses Des réponses DP restreintes ont également été décrites lors d'infection par des parasites tels que *Plasmodium Falciparum* [Guttinger et al., 1991] ou *Toxoplasma Gondii* [Saavedra et al., 1991] par un champignon, *Blastomyces derma-*

tidis [Klein et al., 1992, Chang et al., 2000] ou encore lors de réponses contre des allergènes : Fel d 1 (allergie aux poils de chats) [van Neerven et al., 1994], Asp f 1 (aspergillose) [Chauhan et al., 1996], Der p 1 (allergie à la poussière) [Higgins et al., 1992, Higgins et al., 1994, Baselmans et al., 2000] etc.

Il est évident que les molécules HLA-DP jouent un rôle aussi important que les molécules HLA-DR dans différentes réponses immunes. Cependant, à ce jour il n'existe aucune prédiction de ligands de HLA-DP hors celle mise au point au laboratoire. Cette méthode de prédiction est présentée dans Chapitre 5.

1.5.5 Maladies associées aux molécules HLA-DP

Le polymorphisme de HLA-DP avait été en grande partie négligé dans les études de susceptibilité aux maladies. Grâce aux améliorations des méthodes de typage de HLA-DP, plus de 100 allèles de HLA-DPB1 ont été identifiés, permettant l'étude de maladies associées aux HLA-DPB1.

Certain allèles HLA-DP semblent jouer un rôle dans le rejet aigu de greffe, le rhumatisme articulaire juvénile pauciarticulaire, et la sarcoïdose [Foley et al., 1997, Steiner et al., 1997]. HLA-DPB1*0501 a été trouvé associé à la sclérose en plaques optico-spinale [Fukazawa et al., 2000, Yamasaki et al., 1999] dans la population japonaise. L'association génétique de certains allèles DPB1 avec la susceptibilité du diabète de type 1 a été rapportées [Noble et al., 1996, Noble et al., 2002, Erlich et al., 1996, Johansson et al., 2003]. Cette association est due soit aux molécules HLA-DP soit au déséquilibre de liaison (LD) entre les allèles DPB1 et d'autres locus effectivement impliqués dans le diabète. L'association positive du diabète de type 1 avec DPB1*0301 a été rapporté dans plusieurs études dans lesquelles le LD de DPB1 avec les gènes DR-DQ a été pris en compte [Erlich et al., 1996, Noble et al., 2000, Cucca et al., 2001]. Un risque accru dû à l'allèle DPB1*0202 et un risque diminué dû à l'allèle DPB1*0402 ont été également rapportés [Noble et al., 2000, Cucca et al., 2001].

De plus, des allèles HLA-DPB1 caractérisés par un résidu d'acide glutamique à la position 69 semblent être associés à la maladie chronique due au béryllium (CBD) [Richeldi et al., 1993, Richeldi et al., 1997, Wang et al., 1999d, Wang et al., 2001]. Il y a 34 allèles concernés, et il est probable que les niveaux de risque changent selon les allèles. La maladie CBD est une maladie principale provoquée par exposition au

béryllium. Elle est caractérisée par l'hypersensibilité au béryllium mesuré par le test de prolifération des lymphocytes. C'est la maladie qui a la plus forte en association avec HLA-DP et qui est la maladie associée à HLA-DP plus étudiée.

En 1993, Richeldi et al. [Richeldi et al., 1993] ont constaté la fréquence la présence des variants de HLA-DPB1 aux codons 36, 55-57, et 65-69 chez les personnes avec et sans CBD. Aucune association significative n'a été détectée entre CBD et variants au codon 36. Cependant, la présence d'acide aspartique et d'acide glutamique en position 55 et 56, respectivement, s'est avérée se produire plus souvent dans des cas de CBD que dans les contrôles (79% vs 41%). L'association est la plus forte pour la famille d'allèles HLA-DPB1 qui codent un résidu acide glutamique à la position 69. C'est le cas de HLA-DP *0201 qui est l'allèle le plus souvent associé avec CBD [Richeldi et al., 1993]. Cette association entre CBD et HLA-DPB1-Glu69 a été confirmée par une autre seconde étude indépendante dirigée encore par Richeldi. [Richeldi et al., 1997].

Dans l'étude de [Wang et al., 1999d], ces auteurs ont confirmé le lien étroit entre le HLA-DPB1-Glu69 et le risque d'avoir le CBD. D'ailleurs, ils ont trouvé que les allèles les plus souvent associés au CBD sont HLA-DPB1*0601, *0901, *1001, *1301, et *1701 par opposition à HLA-DP *0201. Leurs résultats suggèrent que ce n'est pas la seule présence de Glu69, mais les allèles spécifiques portant Glu69 et leur nombre de copie qui (homozygotes ou hétérozygotes) confèrent la plus grande susceptibilité à CBD des individus exposés au béryllium [Wang et al., 1999d].

Rossman et al ont conduit une étude sur la génétique de la sensibilité au béryllium et du CBD. Ils ont trouvé des patients ayant une prolifération lymphocytaire positive au béryllium qui n'ont pas la maladie clinique. Pourtant 90% de ces patients ont un Glutamate en position 69 contre 84% chez des patient CBD. De plus, la présence de la lysine à la position 11 (HLA-DPB1 Lys11) et la présence de l'acide aspartique à la position 55 (HLA-DPB1-Asp55) ont été sensiblement associés à l'hypersensibilité au béryllium, mais cette association n'est significative que seulement en présence de HLA-DPB1-Glu69. En outre, il n'y avait aucune différence entre les fréquences de HLA-DPB1-Glu69-Lys11 et HLA-DPB1-Glu69-Asp55 parmi des personnes avec CBD. Les auteurs ont conclu que HLA-DPB1-Glu69 était l'épitope le plus important dans le développement de l'hypersensibilité au béryllium, mais il ne pouvait pas être employé pour prédire si quelqu'un développerait CBD [Rossman et al., 2002].

1.5.6 L'intérêt des molécules HLA-DP4 pour la vaccination peptidique

Les atouts majeurs d'un vaccin peptidique sont la spécificité de la réponse induite et le faible niveau de risque comparé aux vaccins composés de virus inactivés ou atténués. Cependant, la diversité et le polymorphisme des molécules HLA II constituent les limites les plus importantes à la caractérisation et l'utilisation des épitopes T. On connaît plus de 200 allèles pour les molécules HLA-DR suggérant qu'un nombre important de peptides est susceptible de les lier. Pour qu'un épitope peptidique soit intéressant pour les études cliniques, il est nécessaire soit qu'il se lie à plusieurs molécules HLA-DR, soit qu'il soit présenté par une molécule HLA très représentée dans la population. D'importants efforts ont été effectués en matière de rechercher des peptides universels qui peuvent être présentés par plusieurs molécules HLA-DR. Par exemple, NY-ESO-1 119-143 peut se lier à 8 molécules HLA-DR [Zarour et al., 2002]; MAGE-A3 267-282 lie les molécules HLA-DR1, DR11 et DR15 avec une forte affinité [Zhang et al., 2003]. Bien évidemment ce sont ces peptides qui sont les meilleurs candidats pour l'immunothérapie.

Une alternative aux molécules HLA-DR est celle des molécules HLA-DP4. La large représentation de fréquences géniques dans la population européenne fait des deux molécules HLA-DP401 et HLA-DP402 une cible pour la recherche d'épitopes. De nombreuses études ont montré que les molécules HLA-DP4 sont parfaitement aptes à présenter des peptides aux lymphocytes T. Plusieurs clones T ont été en effet isolés d'antigènes très variés tels que la toxine tétanique [Wyss-Coray et al., 1992] le virus de l'hépatite B [Celis and Karr, 1989], le virus de la rage [Celis et al., 1990], le bacille de la tuberculose [Gaston et al., 1991] et l'allergène majeur de *Dermatophagoïde pteronissimus* [Higgins et al., 1992]. Dans le cas des antigènes tumoraux, deux épitopes restreints par DP4 ont été découverts respectivement dans MAGE-A3 et NY-ESO-1 par l'équipe de Pierre van den Bruggen du laboratoire de Thierry Boon (Bruxelles, Belgique) et l'équipe de Steven Rosenberg (New York, USA). Plusieurs études cliniques ont été lancées pour évaluer d'intérêt immuno de ces peptides.

Clairement, un intérêt croissant existe pour les épitopes T spécifiques de HLA-DP4. D'après le motifs de liaison déterminé par Castellie et al., les deux molécules HLA-DP4 possèdent un motif de liaison très proche et partagent une très large part de

leur répertoire peptidique. Les molécules HLA-DP4 définissent un nouveau supertype de molécules HLA II, c'est à dire un ensemble de molécules ayant en commun un large répertoire de peptides. Cette observation accentue l'intérêt des molécules HLA-DP4 pour la vaccination. Toutefois, aucune recherche exhaustive de peptides ligands des molécules HLA-DP4 n'a été faite dans le but de sélectionner plusieurs peptides immunogènes susceptibles d'être utilisés pour élaborer un vaccin peptidique de large impact. Par conséquent, une de nos stratégies pour la recherche d'épitopes T est de chercher les peptides ligands de HLA-DP4 dans la famille des antigènes MAGE-A. Ce travail est présenté sous forme d'article dans Chapitre 6.

Chapitre 2

Immunité antitumorale

Le concept de l'immunosurveillance, défini par Burnet FM en 1967 [Burnet, 1967], propose que le système immunitaire est capable spontanément de détecter les cellules tumorales et de les détruire. Si des cancers se développent c'est parce que les cellules tumorales sont capables d'élaborer des mécanismes d'échappement dès l'initiation des réponses immunes [Burnet, 1957]. Les premières observations faites sur des souris nude n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse de façon incontestable. Les souris nude dépourvues de thymus possèdent des lymphocytes T en nombre restreint et disposent également de lymphocytes NK.

Plus tard dans les années 70 et 80, l'observation de patients immunodéprimés, en particulier sous traitement anti rejet de greffes, a bien montré une augmentation importante de l'incidence de cancers. Cela atteste le rôle du système immunitaire dans la prévention du processus de cancérisation. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, certains types de cancers apparaissent plus fréquemment que d'autres. Par exemple, la fréquence de lymphome B induit par le EBV. La présence d'un virus oncogène serait déterminante.

Il faut en fait attendre les années 90 avec les expériences d'inactivation des gènes RAG-1 et 2, du récepteur de l'IFN- γ et du transducteur de transcription STAT-1 sur des modèles murins KO pour démontrer l'immunosurveillance anti-tumorale. Les gènes RAG-1 et RAG-2 sont les composants de la recombinaise indispensable au mécanisme de recombinaison somatique des gènes VDJ des immunoglobulines et des récepteurs des lymphocytes T (TCR) et B (BCR). La recombinaise est un complexe d'enzymes qui fonctionnent ensemble pour induire la réaction de recombinaison. Les

souris KO dépourvues du gène RAG-1 et RAG-2 souffrent d'un blocage complet du développement lymphocytaire au stade du réarrangement des gènes. Les souris dépourvues des récepteurs de l'IFN ont leur système immunitaire inné et adaptatif modifié [Dighe et al., 1994, Shankaran et al., 2001]. Les protéines STAT sont activées par la liaison des IFN à leurs récepteurs. Elles sont phosphorylées par une kinase et passent dans le noyau où elles activent la transcription de différents gènes. Les protéines codées par ces gènes contribuent à la croissance et à la différenciation des lymphocytes, fonctions déficientes chez les souris KO. Les cellules NK ne sont donc pas activées et les souris sont incapables de développer une réaction immunitaire cytotoxique. Les déficits profonds que ces manipulations entraînent, s'accompagnent d'une augmentation claire de l'incidence des cancers chez l'animal.

La survenue d'une transformation maligne est donc prévenue par deux voies. Une voie intrinsèque aux cellules, contrôlée par des systèmes biologiques. Par exemple, le contrôle exercé par la p53 prévient la prolifération et le maintien en vie des cellules dont l'ADN est lésé. Une voie extrinsèque surveille l'apparition de nouveaux antigènes par les mécanismes impliquant l'immunité innée et l'immunité adaptative. Expérimentalement, les souris transgéniques, pour lesquelles les deux voies de contrôle sont altérées (p53 -/- et IFN -R/-) développent des tumeurs plus diverses avec une incidence plus grande que les souris contrôle non modifiées [Kaplan et al., 1998].

2.1 Immunité innée antitumorale

L'immunité innée, du fait qu'elle implique l'utilisation de récepteurs relativement invariants, et d'effecteurs immédiatement activables, est généralement considérée comme pré-existante et antérieure à l'installation d'une immunité adaptative spécifique. Elle implique un grand nombre de cellules différentes comme les cellules épithéliales, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les leucocytes polynucléaires, les cellules NK, des sous-populations de lymphocytes (les cellules B-1, les cellules NKT, les lymphocytes T exprimant le récepteur $\gamma\delta$), ainsi que les granulocytes basophiles et éosinophiles.

2.1.1 Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK

Les cellules NK sont des lymphocytes du système immunitaire inné qui ont un rôle majeur dans la reconnaissance et l'élimination immédiat des cellules qui n'expriment pas les marqueurs du soi comme les molécules de HLA I, des cellules infectées par des agents pathogènes et des cellules cancéreuses. Cette reconnaissance est médiée par ensemble complexe de récepteurs distribués de manière stochastique sur les différentes cellules NK d'un individu. Les cellules NK agissent par différents mécanismes effecteurs : production de cytokines (IFN- γ et TNF- α), lyse des cellules cibles (indépendante des anticorps), et destruction des cellules recouvertes d'anticorps IgG (ADCC).

Il est bien connu depuis longtemps que les cellules NK in vivo tuent spontanément des cellules tumorales déficientes pour des molécules de HLA I [Whiteside and Herberman, 1995]. Cependant, cet effet anti-tumoral peut être inhibé si l'expression de HLA I sur les cellules tumorales est restaurée [Ljunggren et al., 1990, Franksson et al., 1993]. Ce mécanisme de reconnaissance s'appelle *Missing self recognition*, modèle de l'inhibition des effecteurs. Les cellules NK possèdent deux catégories de récepteurs de surface qui contrôlent leur activité cytotoxique : récepteurs inhibiteurs et activateurs. Les récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules de HLA I dotent les cellules NK de la capacité d'attaquer les cellules de soi qui ont perdu les molécules de HLA I. Trois familles de récepteurs inhibiteurs ont été identifiées : Ly49 chez la souris [Yokoyama and Jacobs, 1989, Karlhofer et al., 1992], récepteurs inhibiteurs cytotoxiques (KIRs, killer cell inhibitory receptors) chez l'homme [Moretta et al., 1993, Colonna and Samaridis, 1995], et récepteurs CD94/NKG2A chez la souris et l'homme [Lazetic et al., 1996]. Ils sont capables d'inhiber l'activité cytotoxique des cellules NK : comme ces récepteurs sont spécifiques des molécules de HLA I, chez l'homme, les molécules de HLA I sur les cellules normales sont reconnues par les cellules NK par l'intermédiaire de KIRs ou des récepteurs CD94/NKG2A et ceux-ci inhibent les signaux des récepteurs activateurs. À l'inverse, les cellules NK éliminent les cellules anormales qui n'expriment pas les molécules de HLA I ou en faible densité.

Il existe aussi un autre mécanisme de la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK : *Induced-self recognition*. Il implique les récepteurs activateurs

(KARs) et leurs ligands [Diefenbach et al., 2000]. Parmi tous les récepteurs activateurs, le récepteur NKG2D et ses ligands sont les plus étudiés. Chez l'homme NKG2D est un homodimère associé à la molécule adaptatrice DAP10 qui transmet le signal à l'intérieur de la cellule en activant la voie P13-kinase [Wu et al., 1999]. Ce complexe est largement exprimé non seulement sur les cellules NK, mais aussi sur les cellules T $\gamma\delta$, les macrophages et les cellules de T CD8+ $\alpha\beta$. Les molécules MIC (MHC class I chain-related protein A and B, MICA et MICB) [Smyth et al., 2001] sont des ligands du récepteur NKG2D chez l'homme comme Rae1 (retinoic acid early-1 proteins) [Diefenbach et al., 2000] et H60 [Malarkannan et al., 1998, Diefenbach et al., 2000] chez la souris. MICA et MICB sont des glycoprotéines de surface très polymorphes, identifiées comme des molécules non classiques du HLA I. Contrairement aux molécules du HLA I, les MICA et MICB ne s'associent pas à la $\beta 2$ microglobuline et ne nécessitent pas le transporteur associé à TAP pour s'exprimer. Dans les tissus somatiques, l'expression de ces protéines semble restreinte à l'épithélium gastrointestinal. En revanche, MICA et MICB sont exprimées par les cellules infectées par des virus ou surexprimant les protéines de choc thermique HSP. L'expression de MICA et MICB est constitutive dans les carcinomes de poumon, sein, rein, ovaire, prostate, colon, mélanome et foie. Ils se lient au récepteur NKG2D et déclenchent la cytotoxicité des cellules NK, même si les cellules tumorales expriment des molécules de CMH de classe I, parce que cette activation est capable de surmonter le signal d'inhibition dû à l'engagement des récepteurs inhibiteurs KIR par les molécules de CMH de classe I [Wu et al., 1999]. De plus, Diefenbach et al. ont montré que la transfection de ligands comme H60 ou Rae1 dans des mélanomes ou lymphomes murins conférait aux cellules NK la capacité de reconnaître ces cellules tumorales et de prévenir in vivo la progression tumorale [Diefenbach et al., 2000]. Ainsi, Les molécules MIC n'ont pas de rôle dans la présentation antigénique, mais fonctionnent comme « signal de danger » pour les cellules T et NK pour activer la cytotoxicité cellulaire. Elles représentent donc un exemple de stimulus de l'immunité innée qui peut augmenter la réponse immune adaptative.

2.1.2 Les cellules NKT se présentent comme des effecteurs anti-tumoraux

Les cellules NKT sont une sous-population de lymphocytes T qui consistent principalement en cellules CD4-CD8- double négatives et CD4+ [Sugie et al., 1996, MacDonald, 1995]. Chez l'homme il existe une troisième sous-population de NKT CD4-CD8+ [Takahashi et al., 2002]. Ces cellules expriment un marqueur particulier, NK1.1, en sus des marqueurs usuels des cellules T. Contrairement aux cellules NK, elles se développent dans le thymus et expriment des TCRs réarrangés (donc variables). Contrairement aux cellules T, les cellules NKT répondent aux antigènes présentés par une molécule atypique du HLA-I, CD1d, et expriment des niveaux intermédiaires de leur TCR. Il existe des cellules NKT qui ont un répertoire très limité de TCRs et présentent souvent le réarrangement caractéristique $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ associé à $V\beta 8.2$, $V\beta 7$ et $V\beta 2$ chez la souris, ou bien $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ associé à $V\beta 11$ chez l'homme [Lantz and Bendelac, 1994, Godfrey et al., 2000]. Il existe aussi des NKT avec un TCR plus polymorphe [Godfrey et al., 2004]

Dans le système murin, l'administration de l'IL-12 est maintenant connue pour induire un effet anti-tumoral [Trinchieri and Scott, 1999]. Des études ont montré que l'IL-12 peut conduire à une activation de cellules NKT $V\alpha 14$. Cela suggère une fonction importante des cellules NKT dans l'effet anti-tumoral [Hashimoto et al., 1995, Takahashi et al., 1996]. L'équipe de Taniguchi au Japon a confirmé cette hypothèse en 1997 : les souris démunies de cellules NKT $V\alpha 14$ ne présentent pas d'effet anti-tumoral induit par IL-12 [Cui et al., 1997]. L'activation des cellules NKT $V\alpha 14$ pourrait passer par la présentation des glycosylceramides par CD1.1 (CD1d chez l'homme). L' α -GalCer pourrait se présenter comme un ligand potentiel du CD1d sur les cellules dendritiques responsable de l'activation des cellules NKT $V\alpha 14$ [Kawano et al., 1997]. En effet, l'injection de α -GalCer in vivo peut activer les NKT et prévenir les métastases tumorales [Kawano et al., 1998]. Chez l'homme, les mêmes observations ont été rapportées : les cellules humaines NKT $V\alpha 24$ activées par α -GalCer déploient une cytotoxicité dépendante de la voie perforine-granzyme contre plusieurs sortes de lignées tumorales humaines [Kawano et al., 1999]. Enfin, en l'absence de stimulateur potentiel comme l'IL-12 et α -GalCer, les cellules NKT peuvent aussi avoir un effet anti-tumoral [Smyth et al., 2000]. Par ailleurs, il existe une population de

NKT produisant de l'IL-13 qui pourrait avoir un rôle pro-tumoral [Terabe et al., 2005]

Les cellules NKT jouent non seulement un rôle direct dans la réponse anti-tumorale, mais aussi dans la réponse immunitaire adaptative en intervenant lors de l'activation de certaines cellules présentatrices de l'antigène, comme les cellules dendritiques.

2.2 Immunité adaptative antitumorale

L'immunité adaptative, caractérisée par l'expansion et la différenciation de lymphocytes spécifiques de l'antigène, constitue une deuxième ligne de défense antitumorale. L'activation des cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène est la première étape indispensable à l'induction de l'immunité adaptative [Janeway, 2001]. Lorsque ces cellules spécialisées captent un antigène, elles sont activées et se dirigent vers le ganglion lymphatique le plus proche où elles se différencient en APCs. Les APCs sont constituées principalement par les DCs, les macrophages et les cellules B que nous avons déjà vus dans le premier chapitre, ces cellules sont toutes issues des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Parmi ces trois types cellulaires, les cellules dendritiques sont considérées comme les plus stimulantes, parce qu'elles sont capables d'activer les lymphocytes T naïfs [Banchereau and Steinman, 1998], et sont appelées pour cela cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.

Une des caractéristiques des APCs est leur expression constitutive des molécules de HLA II. Nous avons déjà vu la présentation des peptides exogènes par les molécules de HLA II qui conduit à l'activation des lymphocytes T CD4 spécifiques de ces antigènes [Turley et al., 2000]. Les APCs peuvent non seulement présenter des antigènes endogènes comme toutes les autres cellules nucléées de l'organisme, mais aussi des antigènes exogènes par les molécules de HLA I, selon un processus spécialisé appelé *cross-presentation* [Albert et al., 1998]. Ces peptides conduisent à l'activation des lymphocytes T CD8 avec ou sans l'aide des lymphocytes T CD4 spécifiques [Rocha and Tanchot, 2004].

La reconnaissance du complexe HLA-peptide par le TCR spécifique de l'antigène constitue un premier signal de l'activation des lymphocytes T. Cependant, ce signal ne suffit pas à induire l'activation fonctionnelle des lymphocytes T. Il doit être renforcé par un deuxième signal dit de costimulation, délivré aussi par les APCs via des molécules de co-stimulation. Ces deux signaux favorisent la formation d'une synapse

immunologique stable, qui amplifie et prolonge la signalisation par le TCR [Huppa and Davis, 2003].

2.2.1 L'interaction TCR/HLA-peptide

Il existe deux types de TCR. L'un formant un dimère $\alpha\beta$ est porté par des lymphocytes T très largement majoritaires dans le sang périphérique, les ganglions et la rate. L'autre formant un dimère $\gamma\delta$ porté par des cellules T abondantes dans les épithéliums muqueux ne sera pas discuté ici car il ne fait pas l'objet de la présente étude.

Le TCR $\alpha\beta$ qui est le mieux connu, associe deux chaînes transmembranaires de 40 à 45 kDa, unies par un pont disulfure. Chaque chaîne est constituée de 2 domaines : un domaine variable (noté $V\alpha$ ou $V\beta$) et un domaine constant (noté $C\alpha$ ou $C\beta$). Ces domaines sont structurés de façon très similaires aux domaines V et C des Igs. D'un point de vue structural, le TCR a donc la taille, l'aspect général et les propriétés fonctionnelles d'un fragment Fab. De même que pour les immunoglobulines, la grande diversité des TCR repose sur un codage génétique particulier qui est basé pour l'essentiel sur les mêmes mécanismes de recombinaison que ceux conduisant au codage aléatoire des Ig.

Le TCR $\alpha\beta$ qui possède la propriété de liaison à l'antigène est associé au complexe CD3. Ce dernier comporte plusieurs chaînes protéiques qui jouent un rôle important dans la transduction du signal. Selon le type de cellule T, le complexe TCR / CD3 est associé soit à la protéine membranaire CD4, soit à la molécule CD8. CD4 interagit uniquement avec les complexes peptide-HLA II des APCs, alors que CD8 reconnaît le complexe peptide-HLA I. Après reconnaissance du complexe peptide-HLA par l'ensemble TCR / CD3 / CD4 ou CD8, les événements de signalisation intracellulaire déclenchés sont complexes. Succinctement, parmi les étapes les plus précoces il y a l'activation de la protéine kinase Lck (appartenant à la famille des Src kinases) suite à l'association des co-récepteurs CD4 ou CD8 avec la molécule de HLA. Lck phosphoryle les motifs ITAM (pour Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) situés dans les régions intracellulaires des chaînes protéiques, et du CD3. Les résidus phosphorylés sont reconnus par les domaines SH2 de ZAP-70 (kinase de la famille Syk), ce qui permet son recrutement. Parallèlement à ce rapprochement de ZAP-70 il y a

relocalisation de l'ensemble des partenaires de la signalisation dans des *lipids rafts* (en français radeaux lipidiques) qui sont des sous domaines membranaires enrichis en cholestérol et glycosphingolipides. Ce phénomène de rapprochement permet une amplification du signal. ZAP-70 activée par Lck, active par phosphorylation plusieurs protéines adaptatrices dont la protéine LAT. Des voies de signalisation parallèles sont activées par les protéines adaptatrices : la voie Ras et la cascade des MAP kinases ainsi que la voie de mobilisation du calcium. Ceci conduit à l'activation de plusieurs facteurs de transcription, comme NFAT et de NF B qui activent directement la transcription de plusieurs gènes.

Ce premier signal résultant de la reconnaissance du complexe HLA-peptide par le TCR, est considéré comme négatif puisque sans le signal 2 induit par les molécules de co-stimulation, il entraîne l'apoptose de la cellule T.

2.2.2 Molécules de co-stimulation

L'activation complète des lymphocytes T nécessite des seconds signaux, appelé signaux de costimulations. Actuellement, les molécules de costimulation les mieux caractérisées, et parmi les plus importantes, sont CD80 et CD86 (appelés aussi B7-1 et B7-2 ou B7) [Lenschow et al., 1996]. Ces molécules B7 engagent le récepteur CD28 sur le lymphocyte T [Green et al., 1994]. Le signal de costimulation induit par CD28 peut augmenter la production de l'IL2 par le lymphocyte T [Wells et al., 1997] et l'expression du récepteur de forte affinité pour l'IL2 [Shahinian et al., 1993]. Nous savons que la synthèse de l'IL2 est déterminante dans la prolifération des cellules T [Schwartz, 1992]. La stimulation de CD28 par son ligand B7 pourrait agir aussi sur la survie des lymphocytes activés en augmentant l'expression du gène antiapoptotique Bcl-XL [Boise et al., 1995]. De nombreux effets directs et indirects de CD28 ont été bien décrits dans la revue de O. Acuto et F. Michel et le terme *second wave* a été utilisé pour décrire l'induction de l'expression des récepteurs des autres molécules de costimulation par la stimulation de CD28 [Acuto and Michel, 2003].

L'expression optimale de B7 par l'APC, comme certaines autres molécules de co-stimulation (ICOSL, OX40L, etc.), dépend également de la stimulation du récepteur CD40 de l'APC par le CD40L du lymphocyte T engagé dans un processus d'activation réciproque [Acuto and Michel, 2003]. Certaines molécules sont impliquées plus

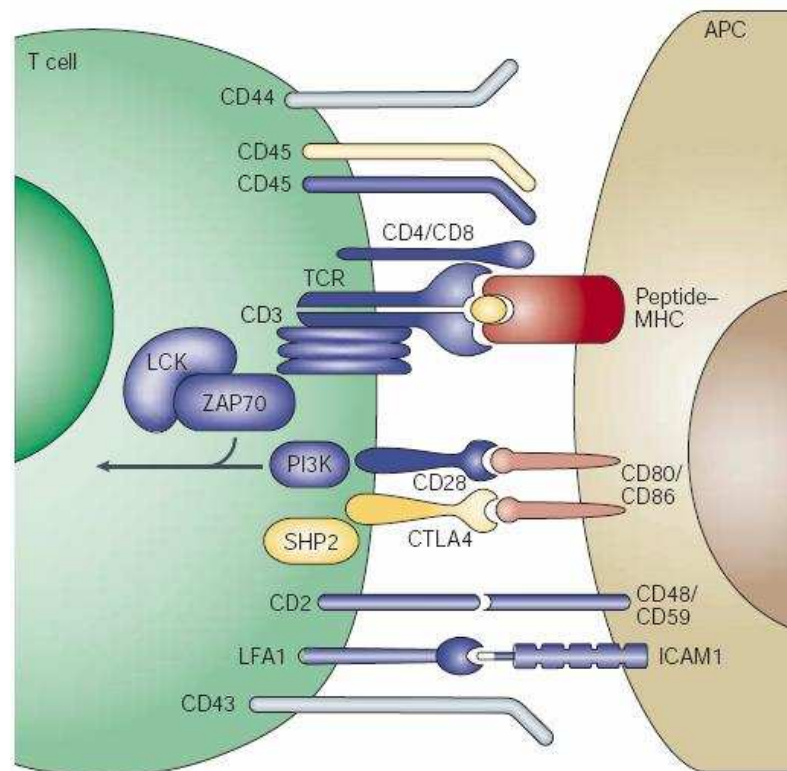
spécifiquement dans l'interaction entre les APCs et les sous-populations des lymphocytes T : CD40, comme OX40L, a une action préférentielle sur les cellules T CD4 ; 4-1BBL sur les lymphocytes T CD8 ; et ICOSL sur les lymphocytes TFH qui aident les lymphocytes B dans les centres germinatifs à se différencier [Whitmire and Ahme, 2000].

Une molécule présentant des homologies avec CD28, est le CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, CD152). Cette molécule s'exprime tardivement après l'activation des lymphocytes T et elle partage avec CD28 la reconnaissance des ligands B7. CTLA-4 joue un rôle opposé à CD28. La liaison de CTLA-4-B7, qui possède une avidité vingt fois plus forte que celle de CD28-B7, envoie un signal inhibiteur au lymphocyte T activé qui limite sa réponse proliférative induite par l'antigène spécifique et CD28 [Chambers et al., 2001]. Des souris Knock-out pour le gène CTLA-4 développent une maladie mortelle en 3-4 semaines caractérisée par une prolifération lymphocytaire massive [Waterhouse et al., 1996].

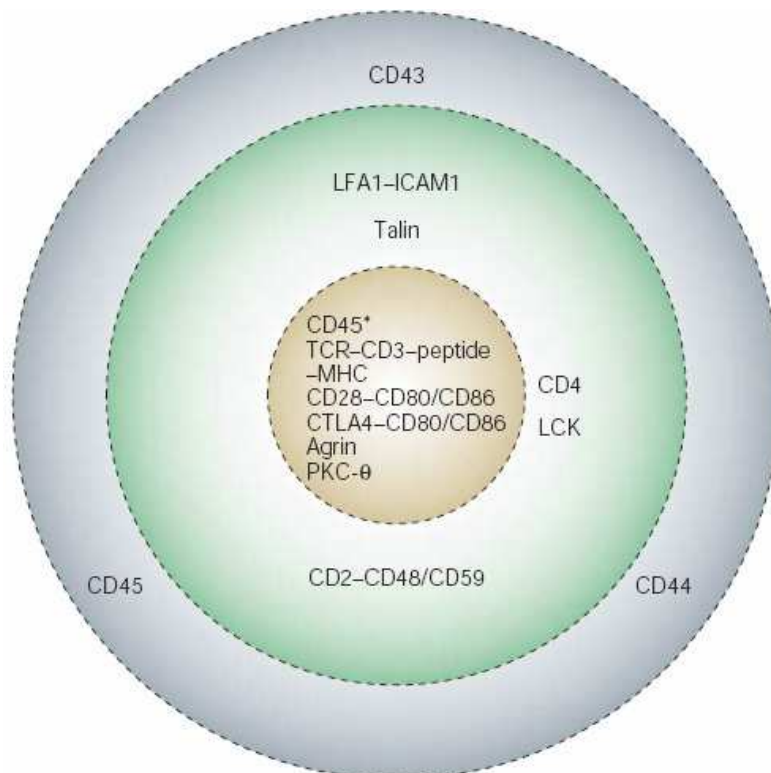
2.2.3 La synapse immunologique

L'interaction des lymphocytes T avec les cellules APCs a été décrite par le terme de synapse immunologique pour la première fois par M.Norcross [Norcross, 1984]. Bien que ce concept ait été évoqué dès 1984, il n'a été largement accepté que depuis une dizaine d'années [Delon and Germain, 2000]. La synapse immune est une interface cellulaire organisée, qui se forme à la jonction entre la membrane de l'APC et celle du lymphocyte T (Fig. 2.1(a)). le TCR joue un rôle essentiel comme support de la spécificité dans la reconnaissance du complexe HLA-peptide, mais il fonctionne au sein d'un important complexe multimoléculaire « synaptique ». Les complexes HLA-peptide/TCR-CD3 ainsi que certaines molécules de costimulation avec leurs récepteurs (CD80/CD86-CD28, CD80/CD86-CTLA4) s'accumulent au centre d'un anneau bordé des molécules d'adhérence (LFA1-ICAM1, CD2-CD48/CD59). Cette structure exclut des molécules à fort encombrement stérique telles que CD43 ou CD45 de la zone de contact avec les APCs [Savage et al., 2002]. (Fig. 2.1(b))

La formation de la synapse immunologique est organisée et modulée dans le temps et dans l'espace et elle facilite la transmission efficace du signal d'activation aux lymphocytes T. La stabilité de la synapse mature peut durer quelques minutes et



(a)



(b)

FIG. 2.1: Vue générale de la synapse immunologique mature. D'après [Huppa and Davis, 2003]

même aller jusqu'à plusieurs heures [Huppa and Davis, 2003]. Cette stabilisation est indispensable pour favoriser une activation optimale qui implique les complexes spécifiques peptide-HLA qui sont rares et dont l'affinité pour le TCR est peu élevée. Finalement, le déclenchement de la mitose et l'augmentation de l'expression de CTLA-4 provoquées par l'activation cellulaire vont contribuer à la déstructuration de la synapse et à l'arrêt du signal d'activation [Egen and Allison, 2002].

2.2.4 Les lymphocytes T CD8+ et leurs mécanismes de cytotoxicité

Les lymphocytes T CD8+ sont les effecteurs principaux de l'immunité adaptative antitumorale. Après leur activation et leur prolifération, les lymphocytes T CD8+ naïfs se différencient en cellules effectrices ou en cellules mémoires. Les cellules T mémoires peuvent être réparties en deux sous-population : TEM (Effector Memory T Cells) et TCM (Central Memory T Cells) [Sallusto et al., 1999]. Les TEM sont capables de répondre rapidement à une stimulation antigénique, les TCM n'exercent pas de fonctions directes et peuvent se différencier en TEM sous stimulation. Cela signifie que ces deux populations représentent deux stades successifs de différenciation, et que les TCM soutiennent la réponse plus tardivement et servent à régénérer la population de TEM [Lanzavecchia and Sallusto, 2000].

L'effet cytotoxique des lymphocytes T CD8+ effecteurs est la fonction principale du système immunitaire adaptatif contre les tumeurs. Ce rôle majeur a été bien montré dans des modèles expérimentaux murins ainsi que dans de nombreuses observations cliniques chez l'homme [Itoh and Platsoucas, 1988, Mandelboim and Berke, 1994, Mackensen et al., 1994]. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) sont efficaces en déclenchant l'apoptose des cellules cibles via de multiples voies de lyse.

2.2.4.1 Voie lytique Perforine / Granzime

L'un des principaux mécanismes d'action des CTLs est la libération dépendante du calcium de granules lytiques spécialisées. Cette libération est provoquée par la reconnaissance de l'antigène à la surface de la cellule cible. Après l'engagement du TCR des CTLs, il est intéressant de noter les réorganisations importantes du cytosquelette d'actine : En effet, le centre organisateur des microtubules (MTOC) se ré-orienté vers

la synapse et intervient dans la ségrégation des molécules de signalisation, dans la relocalisation de l'appareil sécrétoire et dans la libération polarisée des lymphokines et des granules cytolytiques dans l'espace délimité par la synapse [Kuhn and Poenie, 2002] (Fig. 2.2).

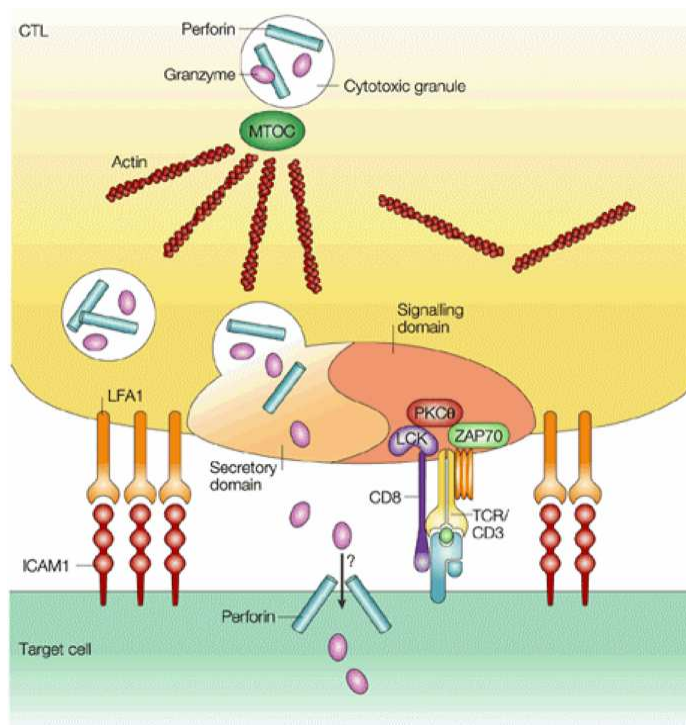


FIG. 2.2: La perforine et les granzymes sont libérés au niveau de la synapse immunologique. D'après [Lieberman, 2003]

Les protéines et les enzymes effectrices cytotoxiques qui induisent l'apoptose sont stockées dans ces granules. Parmi celles-ci, la perforine et les granzymes (dont les mieux caractérisés sont les granzymes A et B) sont les plus connues. La perforine est capable de se polymériser en présence de calcium pour former des pores à travers la membrane des cibles, cependant la fonction précise de ces pores n'est pas totalement clarifiée [Lieberman, 2003]. Depuis longtemps, il était admis que les granzymes ne pénétraient dans les cellules cibles qu'à travers ces pores transmembranaires formés par la perforine [Janeway, 2001]. Ce concept a été bouleversé par l'internalisation du granzyme B dans la cellule cible en l'absence de perforine [Pinkoski et al., 1998]. Plus précisément, le récepteur du granzyme B à la surface de la cellule cible, qui permet l'entrée de la molécule par endocytose, a été identifié [Motyka et al., 2000] : c'est le récepteur du mannose 6 phosphate (MPR), déjà connu pour cibler les acides

hydrolases vers les lysosomes à la sortie du trans Golgi, ainsi que les granzymes A et B vers les granules cytotoxiques [Griffiths and Isaaz, 1993]. Cependant le mécanisme exact concernant l'endocytose des granzymes et de perforine n'est pas clair [Trapani and Smyth, 2002]. Une fois que ces granzymes entrent dans les cellules cible, ils déclenchent l'apoptose avec l'aide de la perforine [Trapani et al., 2000].

De nombreuses autres protéines sont présentes dans les granules d'exocytose des CTLs et possèdent aussi leur rôle dans l'activité cytotoxique [Lieberman, 2003]. Parmi lesquelles, il faut citer la granulysine, une protéine toxique qui détruit directement les membranes bactériennes [Pena and Krensky, 1997] et induit l'apoptose de lignées tumorales in vitro sous forme recombinante [Wang et al., 2000].

2.2.4.2 Voie apoptotique Fas/Fas ligand

Les CTLs peuvent également déclencher l'apoptose via la voie Fas/Fas Ligand qui ne dépend pas de la perforine ni du calcium, bien que ce dernier soit nécessaire pour la synthèse et la mobilisation intracellulaire de FasL [Helgason et al., 1992].

Les CTLs expriment à leur surface les molécules qui appartiennent à la superfamille du TNF et qui sont actives sous forme trimérique comme FasL. FasL vise des cibles moléculaires Fas qui font partie du groupe du récepteur du TNF comme TNFR-1. FasL induit la trimérisation du récepteur FAS (CD95) et donc de ses trois domaines de mort (Death domain) [Itoh and Nagata, 1993], puis entraîne l'association avec la protéine adaptatrice FADD (Fas associated death domain) [Chinnaiyan et al., 1995]. FADD, par l'intermédiaire de son domaine NH₂-terminal appelé DED (death effector domain), s'associe avec le domaine DED du prodomaine de la procaspase-8 et l'active [Muzio et al., 1996]. Le complexe multiprotéique formé à la membrane par Fas, FADD et la caspase-8 est appelé le DISC (death-inducing signaling complex) [Kischkel and Hellbardt, 1995]. La caspase-8 déclenche deux voies de signalisations -directe ou indirecte- de la caspase-3 pour aboutir à l'apoptose [Scaffidi et al., 1998] : dans la voie directe, la caspase-8 activée peut induire une cascade d'activation de caspases qui activent directement la caspase-3, à condition que sa quantité soit suffisante (système de type I) ; dans la voie indirecte, la caspase-8 activée peut, par l'intermédiaire du clivage de la protéine pro-apoptotique Bid [Li et al., 1998a, Luo et al., 1998], induire la relocalisation de BAX au niveau de la membrane mitochondriale ; ensuite, le cytochrome

C, libéré par la mitochondrie, interagit avec Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor-1) et la procaspase-9. Cette interaction entraîne l'activation de la procaspase-9 en caspase-9 qui elle-même est responsable de l'activation de la caspase-3 (système de type II) [Daugas et al., 2000] (Fig. 2.3). Une autre protéine AIF (Apoptosis inducing factor) pourrait être libérée par la mitochondrie pour déclencher directement l'apoptose, indépendamment de l'activation des caspases [Daugas et al., 2000, Joza et al., 2001].

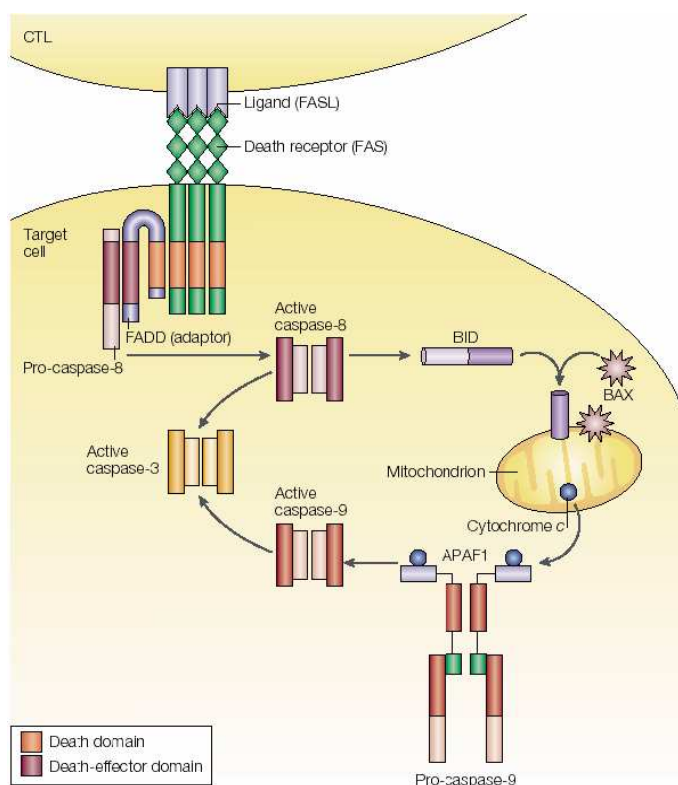


FIG. 2.3: Induction de l'apoptose par FasL. D'après [Barry and Bleackley, 2002]

D'autres molécules parmi les homologues de TNF peuvent jouer aussi un rôle cytotoxique. Leurs récepteurs possèdent un domaine cytoplasmique homologue à celui de Fas, responsable de la transduction du signal menant à l'apoptose, et parmi ces récepteurs, certains ont été bien caractérisés, comme TNFR1, DR3 ou Apo3, DR4 ou Apo2/TrailR1, DR5 ou TrailR2, DR6 [Ashkenazi and Dixit, 1998].

Les CTLs peuvent aussi exprimer leur cytotoxicité par la sécrétion des cytokines comme l'IFN- γ , le TNF- α et le TNF- β qui contribuent à la défense anti-tumorale par différents mécanismes. En conclusion, les CTLs sont capables de déclencher l'apoptose

au travers de plusieurs voies, activées indépendamment dans des contextes différents, mais qui pourraient aussi se réunir pour agir de concert.

2.2.5 La présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8+

La présentation d'épitopes T CD8+ suit la voie classique de la présentation endogène de HLA I. Cependant, la plupart des tumeurs manquent des molécules de costimulation exigées pour l'induction de CTLs, si bien que la présentation endogène d'antigènes par les cellules tumorales est inefficace pour induire une réponse CTL et activer les précurseurs natifs CD8 [Ochsenbein et al., 2001]. Alternativement, il a été proposé que la voie primaire de la présentation d'antigènes aux CTLs dans des patients atteints de cancer utilise les APC professionnelles, en particulier les DCs [Sotomayor et al., 2001]. Ces dernières captent les antigènes et les dégradent en peptides. Ces fragments peptidiques sont alors chargés sur les molécules de HLA II et dans certains cas de HLA I. Le mécanisme qui consiste à présenter les peptides dérivés des antigènes exogènes par les molécules de HLA I est appelé présentation croisée ou *cross-presentation*. La connaissance des mécanismes moléculaires et de la nature des antigènes impliqués dans la présentation croisée reste encore limitée.

Les macrophages et les cellules dendritiques sont les cellules les plus compétentes pour la présentation croisée. D'autres types cellulaires comme les lymphocytes B, les kératinocytes, les cellules endothéliales sont capables, *in vitro*, de présentation croisée mais avec une efficacité plus faible. Les cellules dendritiques restent les cellules les plus efficaces pour assurer l'activation de lymphocytes T CD8+ spécifiques *in vivo*.

Plusieurs études ont suggéré que la présentation croisée d'antigènes issus des cellules tumorales apoptotiques ou nécrotiques et des cellules infectées par les virus peut efficacement charger les molécules de HLA I et de HLA II des DCs dérivé de monocytes, qui peuvent activer les cellules T CD8+ et CD4+ spécifiques de tumeurs ou de virus [Orange et al., 2004]. Pour activer les CTLs effecteurs par cette voie, les DCs doivent recevoir un stimulus de maturation aussi qu'un signal provenant d'une cellule T CD4 (par exemple CD40L).

2.2.6 Fonction des lymphocytes T CD4+ dans l'immunité antitumorale

L'importance des lymphocytes T CD4+ dans la réponse immune antitumorale n'a été finalement bien documentée que depuis ces dix dernières années [Ossendorp et al., 2000], alors que le rôle des cellules T CD4+ dans l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) CD8 avait été documenté dès 1982 [Keene and Forman, 1982]. Beaucoup d'efforts de recherche ont préférentiellement portés sur l'étude des lymphocytes T CD8+, car la plupart de tumeurs n'expriment que les molécules de HLA-I. Les essais cliniques utilisant des épitopes T CD8+ ont montré des effets thérapeutiques et peuvent empêcher la croissance de tumeur [Rosenberg et al., 1998, Marchand et al., 1999]. Cependant, les réponses immunes n'étaient pas observées chez tous les patients. Elles étaient souvent faibles, transitoires et insuffisantes pour éradiquer les cellules tumorales. Ceci a favorisé l'intérêt d'utiliser des peptides antigéniques restreints aux molécules HLA II de manière à stimuler des lymphocytes T CD4+. Les cellules T CD4+ sont en effet nécessaires pour obtenir une immunité antitumorale efficace.

2.2.6.1 Les sous-populations de lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ peuvent se différencier en plusieurs sous-populations. Les deux sous-populations les plus connues sont les cellules Th1 et Th2. Les cellules Th1 secrètent principalement de l'IFN- γ ., de l'IL-2, de l'IL-12, du TNF- α et du TNF- β et conduisent à une immunité de type cellulaire. Elles jouent un rôle dans l'activation des cellules NK, dans l'amplification des fonctions des macrophages et dans la différenciation des cellules cytolytiques. Elles contribuent également à l'élimination des pathogènes intracellulaires. Par contre, Les cellules Th2 produisent préférentiellement de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-10, de l'IL-13 et du TGF- β et elles mènent plutôt à une immunité de type humorale. Elles sont chargées de l'activation des lymphocytes B, de l'induction de la sécrétion d'immunoglobulines, de l'activation de mastocytes et éosinophiles et elles sont aussi antagonistes des Th1 par l'effet de l'IL-4 [Mosmann et al., 1997, Romagnani, 1997].

Actuellement, les mécanismes qui déterminent si une cellule T CD4+ va se différencier en Th1 ou Th2 ne sont pas entièrement définis. Cependant, nous connaissons

quelques paramètres qui peuvent fortement influencer la différenciation des lymphocytes T : certaines cytokines présentes dans les phases initiales de la différenciation (Comme l'IL12 pour Th1 ou l'IL-4 pour TH2) [Liew, 2002, Trinchieri, 2003] ; l'affinité du TCR et la quantité d'Ag présentée par les APCs (Faible affinité et/ou quantité pour les Th2) [Boonstra et al., 2003] ; des cosignaux rencontrés lors de l'activation des lymphocytes T CD4+ (B7-CD28 ou ICOSL-ICOS pour les Th2) [Coyle et al., 2000] ; et la cinétique d'activation des APCs (une courte durée pour les Th1) [Langenkamp et al., 2000].

Il existe aussi d'autres sous-populations de CD4 : une population nommée Th3 a été découverte par l'équipe de H.L. Weiner dans le contexte de la tolérance orale [Khoury et al., 1992]. Le profil de production des cytokines de Th3 est caractérisé par la sécrétion de quantité élevées de TGF- β . Récemment, on a rapporté que les cellules T CD4+ isolées des joints enflammés des patients présentant la maladie de Lyme contiennent une sous-population de cellules T CD4+ qui sécrètent l'IL-17. Cette sous-population est distincte de celles qui produisent IL-4 ou l'IFN- γ . Elle est nommée Th17 ou THIL-17 [Harrington et al., 2006].

Les clones T CD4 obtenus par l'équipe de H. Groux, qui possèdent une propriété suppressive de la prolifération des lymphocytes T effecteurs, ont été dénommés Tr1. Ceux-ci sont capables de produire une quantité élevée d'IL-10 et d'IL-5, un faible taux de TGF- β et d'IL-2 et d'IFN- γ [Levings et al., 2001], mais pas d'IL-4 [Groux et al., 1997]. Une autre sous population de lymphocytes T CD4, appelée Treg, exprime constitutivement la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) et la molécule CTLA-4. Ces cellules expriment également le facteur FoxP3. Elles sécrètent après activation des quantités élevées de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 ou le TGF- β [Jonuleit et al., 2002, Fehervari and Sakaguchi, 2004].

2.2.6.2 Rôle crucial des lymphocytes T CD4+ dans l'immunité spécifique antitumorale

Initiation de la réponse immune Dans la plupart des cas de tumeurs dans un contexte non inflammatoire, l'activation des CD8+ naïfs est initiée par les cellules T CD4+ spécifiques par l'intermédiaire de l'activation des APCs. Ces mécanismes ne sont pas tout à fait clarifiés [Toes et al., 1999]. Cette initiation a été bien démontrée

dans le modèle des souris knock-out pour le gène CD4 ou par la méthode de déplétion des cellules T CD4⁺ par les anticorps anti-CD4 [Hung et al., 1998]. Depuis les années 90, on a découvert que l'interaction entre la molécule CD40 exprimée par les APCs et leur ligand CD40L (CD154) exprimé par les T CD4⁺ est impliquée dans l'immunité protectrice anti-tumorale [Mackey et al., 1998]. En plus, cette interaction joue un rôle crucial dans l'initiation et l'activation des T CD8⁺ [Bennett et al., 1998] : les lymphocytes T CD4⁺ sont activés successivement par l'antigène présenté par les molécules de CMH classe II des APCs, puis par un signal de costimulation venant des APCs. Ensuite, à l'inverse, ces APCs peuvent être activées par les T CD4⁺ avec l'interaction CD40L-CD40 et devenir compétentes pour initier les T CD8⁺ par la voie CMH classe I restreinte [Bennett et al., 1998].

Maintenance de la fonction et la prolifération des lymphocytes T CD8⁺

Les cellules T CD4⁺ sont aussi essentielles dans la maintenance de la prolifération et des fonctions des effecteurs T CD8⁺ (CTLs) via la sécrétion des cytokines dont l'IL-2 est la plus connue. IL-2 participe à la différenciation et à la survie des CTLs, elle contribue à leur protection contre l'apoptose et l'anergie, à la persistance de leur capacité cytotoxique et au support de leur production de cytokines [Rosenberg et al., 1998].

Inhibition de la croissance de tumeur en l'absence des lymphocytes T CD8⁺

Giuntoli et ses collègues ont découvert qu'il existe une activation directe des CTLs par les T CD4⁺ : l'effet cytotoxique des CTLs peut être augmenté par les lymphocytes T CD4⁺ au travers des molécules de costimulation (par exemple : CD27, CD134 et HLA II) [Giuntoli et al., 2002]. Les autres études ont démontré que les lymphocytes T CD4⁺ non seulement arrivent à maintenir le nombre des lymphocytes T CD8⁺, mais également à moduler l'environnement tumoral pour favoriser l'infiltration des T CD8⁺ [Marzo et al., 2000] et à réactiver des CTLs mémoires [Gao et al., 2002]. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent aussi éradiquer les cellules tumorales au travers du recrutement et de l'activation des autres cellules effectrices comme les macrophages et les éosinophiles [Mattes et al., 2003]. Dans l'inhibition de la croissance de tumeurs, le rôle pivot des cellules T CD4⁺ a été démontré par différentes approches expérimentales. D'une part, en l'absence des lymphocytes T CD8⁺, des lymphocytes B et

des cellules NK, les cellules T CD4+ peuvent parvenir à inhiber la prolifération des cellules tumorales in vivo, et même à les lyser in vitro dans les modèles murins [Lundin et al., 2003, Flynn and Stockinger, 2003]. D'autre part, chez la souris knock-out pour le gène CD4 la croissance de la tumeur est mal contrôlée [Hung et al., 1998]. Les T CD4+ peuvent aussi induire une cytotoxicité directe par la voie Trail [Thomas and Hersey, 1998] ou perforine/granzymes [Echchakir et al., 2000] dans des modèles tumoraux différents. Certaines cytokines comme l'IFN- γ , qui sont sécrétées par les lymphocytes T CD4+, pourraient être impliquées dans les activités anti-tumorales et dans la destruction de la vascularisation tumorale [Qin and Blankenstein, 2000]. Récemment, l'équipe de JY Niederkorn a découvert que dans un modèle de tumeur intra-oculaire l'IFN- γ sécrété par les cellules T CD4+ elles-mêmes est indispensable à leur activité lytique des cellules tumorales via la voie Trail/TrailR [Wang et al., 2003].

Activation de Cellules B par les cellules Th2 Les Th2 peuvent activer les lymphocytes B qui se différencient en plasmocytes. Les anticorps sécrétés par ces plasmocytes contribuent à la réponse humorale anti-tumorale [Glennie and Johnson, 2000]. De plus, on a démontré une collaboration entre l'immunité anti-tumorale cellulaire et humorale dans certains modèles [Reilly et al., 2001].

En conclusion, les cellules T CD4+ peuvent induire un effet anti-tumoral par des mécanismes variés. Elles peuvent jouer un rôle crucial dans l'initiation des T CD8+ en assurant un apprêtement de APCs via l'interaction CD40L et CD40. Elles sécrètent des cytokines pour maintenir la fonction et la prolifération des CTLs, elles inhibent aussi la croissance de tumeurs directement ou indirectement et apportent une aide indispensable pour l'activation des lymphocytes B [Wang, 2001]. (Fig. 2.4)

2.2.7 La présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD4+

Les DCs sont les APCs principales pour présenter les antigènes exogènes aux cellules T CD4+ naïves. Lorsque les DCs captent un antigène, elles sont activées et se dirigent vers le ganglion lymphatique le plus proche où elles se différencient en APCs. Dans le cas des antigènes tumoraux. Ces derniers intègrent successivement

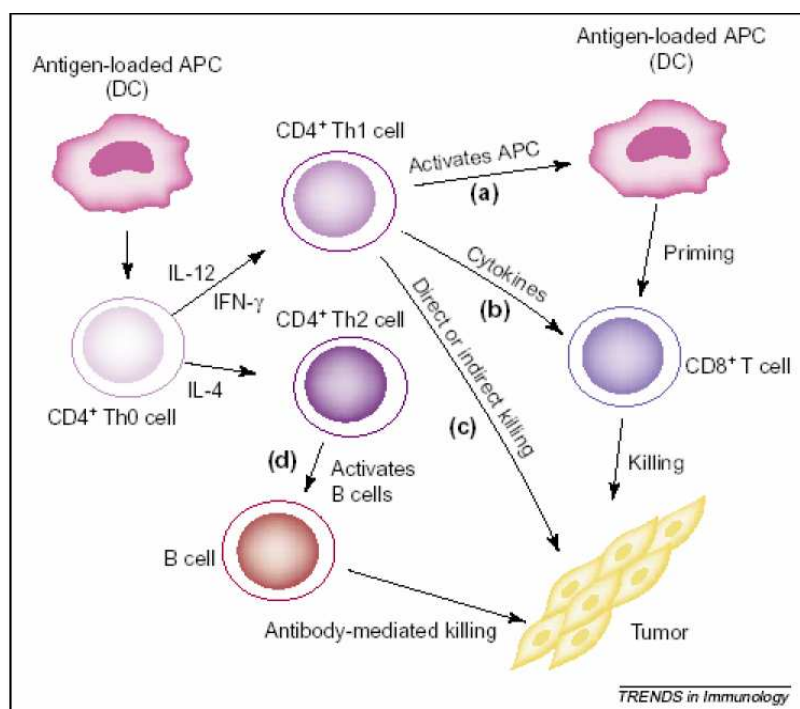


FIG. 2.4: Rôle des cellules T CD4+ dans la modulation des réponses immunes anti-tumorales. D'après [Wang, 2001]

les différents compartiments de la voie endocytaire où ils sont dégradés par diverses enzymes protéolytiques en peptides qui s'associent alors aux molécules de HLA II. Les complexes sont finalement dirigés vers la surface de DCs et présentés aux cellules T CD4+ naïves. Ce processus classique désigné habituellement sous le nom de la voie de présentation exogène. C'est une voie principale pour la présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD4+.

Cependant, il existe une autre voie de présentation des antigènes tumoraux aux cellules T CD4+. Certaines tumeurs expriment des molécules de HLA II qui peuvent présenter les peptides antigéniques directement aux cellules T CD4+. Cette voie de présentation est appelée "la voie de présentation endogène des molécules HLA II". C'est à dire que les molécules de HLA II peuvent présenter des protéines produites par les cellules elles-même. Dans le cas de tumeur, les cellules tumorales pouvant exprimer les molécules de HLA II fonctionnent comme des APC. Par exemple, deux peptides de MAGE-A3 sont présentés à la surface de cellules tumorales lesquelles sont reconnus par des cellules T CD4+ spécifiques de ces peptides [Schultz et al., 2000, Manici et al., 1999]. Cependant, le mécanisme de cette voie de présentation n'est pas encore

clair. Il reste à déterminer où a lieu le chargement des peptides dérivés des protéines cytosoliques. Les peptides se lient-ils aux molécules de HLA II en compétition avec la chaîne invariante dans le réticulum endoplasmique ? Les peptides sont-ils chargés par les molécules de HLA II dans l'endosome ou le chargement de peptides est-il du à l'autophagie ou d'autres mécanismes ? Récemment on a montré que des peptides cytosolique peuvent être présentés par les molécules de HLA II par le mécanisme de l'autophagie [Dengjel et al., 2005]. Ce dernier joue un rôle dans la voie de dégradation endosomiale/lysosomiale et il est responsable de l'introduction de composants intracellulaires dans cette voie. L'autophagie est requise pour le renouvellement des composants cellulaire, en particulier en réponse à des conditions de culture appauvries en nutriments [Klionsky and Emr, 2000].

Cependant, la plupart de cellules tumorales expriment un niveau bas de molécules de HLA II, de plus il manque les molécules de co-stimulation. En conséquence, l'activation de cellules T CD4⁺ est assez difficile par cette voie de présentation. Ainsi l'augmentation de l'expression de molécules de HLA II sur les cellules tumorales par la transfection de gènes codant les molécules de HLA II, ainsi que la co-expression de molécules de co-stimulation sont devenues une stratégie pour développer des vaccins à base de cellules tumorales. Les études *in vivo* ont démontré l'efficacité protectrice et thérapeutique de ces vaccins dans les multiples modèles de tumeurs murines comprenant des sarcomes, des mélanomes, et des carcinomas mammaires, et pour les tumeurs primaires comme pour des tumeurs metastatiques [Ostrand-Rosenberg et al., 1990, Baskar et al., 1995, Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 1998, Pulaski et al., 2000].

2.2.8 Expression des molécules HLA II par les tumeur

L'expression constitutive des molécules HLA II est normalement limitée aux DCs, macrophages, et lymphocytes B. Mais elle se produit également fréquemment dans plusieurs types de tumeurs, en particulier du mélanome. De plus, le traitement avec l'IFN- γ peut induire l'expression des molécules HLA II sur les cellules de mélanomes [Boon et al., 2006] et sur des cellules qui n'expriment pas normalement HLA II, telles que des carcinomas ovariens et de sein.

Chez environ un tiers des patients atteints de mélanome, les CTLs spécifiques de tumeur ont été trouvés dans les cultures des TILs cultivées avec l'IL-2 [Schwart-

zentruber et al., 1994]. Les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de tumeur sont naturellement présents dans un pourcentage significatif des TILs spécifiques de mélanomes. Les études récentes ont commencé à explorer les lymphocytes T CD4⁺ réactifs de mélanome. Par exemple, Les lymphocytes T CD4⁺ humains tumeur-réactifs qui reconnaissent de multiples epitopes de gp100 [Li et al., 1998b, Touloukian et al., 2000, Lapointe et al., 2001] et NY-ESO-1 [Zeng et al., 2000, Jager et al., 2000, Zarour et al., 2000] ont été identifiées. Dans un travail dirigé par Rosenberg [Robbins et al., 2002], deux clones de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de tumeur ont été isolés à partir de TILs d'un patient atteint de mélanome. Ils ont été testés pour leur capacité à reconnaître les antigènes qui sont reconnus par les CTLs. Les résultats montrent qu'un clone a reconnu un épitope exprimé dans les deux antigène TRP-1 (tyrosinase-related protein) et TRP-2 dans le contexte de HLA-DR15. L'autre clone a reconnu un épitope de gp100 présenté par la même molécule HLA-DR15. Bien que la lyse de cellules cibles ait été généralement associée aux cellules T CD8⁺, plusieurs exemples de cellules T CD4⁺ lytiques ont été rapportées. Par exemple, les lymphocytes T CD4⁺ tumeur-réactifs qui sont directement lytiques pour des cellules de sarcome ou les cellules de mélanome [Robbins et al., 2002] ont été décrits. Ces observations fournissent une impulsion pour développer des stratégies orientées sur la génération des cellules T tumeur-réactives restreintes aux molécules HLA II.

Cependant, il existe aussi une autre population de lymphocytes T CD4⁺ qui ont un rôle suppressif pour la prolifération et les fonctions des cellules effectrices. C'est les cellules Treg (CD4⁺CD25⁺). Dans le travail dirigé par H.F Wang [Wang et al., 2004], les lymphocytes T CD4⁺ dérivés de TILs d'un patient atteint de mélanome possède une activité suppressive sur la réponse proliférative des cellules T CD4⁺ naïves après la restimulation de l'anticorps anti-CD3. Ces cellules T CD4⁺ sont spécifiques de l'antigène LAGE. la présence des cellules Treg spécifiques aux sites de tumeur pourrait avoir joué un rôle significatif dans la suppression de l'immunité antitumorale. En effet, l'enlèvement des cellules Treg par un anticorps anti-CD25 chez les modèles animaux a augmenté les réponses antitumorales [Sakaguchi et al., 2001, Suttmuller et al., 2001]. Ces observations suggèrent que le succès de l'immunothérapie à base de peptide pour le cancer et des maladies autoimmunes puisse finalement dépendre de l'équilibre entre les cellules Treg et effectrices [Powrie and Maloy, 2003]. De nouvelles stratégies qui stimulent simultanément les cellules T CD4⁺ effectrices tout en empêchant ou

épuisant les cellules Treg sont nécessaires pour tourner cet équilibre dynamique vers les cellules T effectrices dans le traitement de cancers.

2.3 Les antigènes tumoraux

Bien que les tumeurs immunogènes de souris aient été décrites dans les années 40 [Gross, 1943], c'est 20 ans après que les premiers antigènes tumoraux humains ont été définis. Dans les années 60, l'antigène carcinoembryonique a été décrit dans le carcinome côlorectal [Gold and Freedman, 1963] suivi de l' α -fetoprotéine dans le carcinome hépatocellulaire [Abelev, 1971]. Les études des animaux avaient permis la définition des antigènes dans des situations de carcinogenèse chimique ou virale, l'on a pensé que les tumeurs humaines étaient relativement non immunogènes. En 1991, l'équipe de Thierry Boon [van der Bruggen et al., 1991] a décrit le premier de ce qui s'avérerait être une famille des gènes nombreux ou appelés MAGE-A et a prouvé que cet antigène pouvait être la cible d'une réponse de cellules T.

2.3.1 Les stratégies d'identification des antigènes tumoraux

L'identification des antigènes tumoraux a été rendue possible par l'obtention de lymphocytes T cytolytiques réactifs vis-à-vis des cellules tumorales. Ces clones de lymphocytes antitumoraux ont été isolés à partir de TILs [Topalian et al., 1989] ou par stimulation in vitro de lymphocytes circulant par les cellules tumorales autologues [Van den Eynde et al., 1989, Boon et al., 1994]. Différentes stratégies ont été mises en oeuvre afin d'identifier les antigènes exprimés à la surface des cellules tumorales reconnus par les lymphocytes antitumoraux.

Stratégie déductive Cette stratégie consiste à mettre en évidence les antigènes peptidiques présentés à la surface des cellules tumorales reconnus par les lymphocytes T cytolytiques antitumoraux. Une approche génétique consiste à transfecter des cellules présentant un haplotype HLA donné par des banques d'ADNc obtenues à partir de cellules tumorales. La reconnaissance des cellules transfectées par les lymphocytes T antitumoraux permet d'identifier le gène codant pour l'antigène. La même démarche est réalisée avec des fragments du gène identifié afin de localiser précisément

la région du gène codant l'antigène peptidique. Finalement, des peptides correspondant à la région identifiée et possédant les résidus d'ancrage au HLA approprié sont synthétisés et testés pour leur capacité à sensibiliser des cellules cibles à la lyse par les CTL antitumoraux [Boon et al., 1992, De Plaen et al., 1997]. Une approche biochimique consiste à identifier les peptides antigéniques après élution de la surface des cellules tumorales. Les peptides tumoraux sont séparés par HPLC et les différentes fractions sont testées pour leur capacité à sensibiliser des cellules cibles à la lyse par les lymphocytes antitumoraux. Les fractions positives sont analysées par spectrométrie de masse et l'antigène tumoral est identifié et séquencé [Cox et al., 1994]. Cette méthode permet l'identification de peptides tumoraux présentant des modifications post-traductionnelles qui ne peuvent pas être déduites de la séquence génétique [Skipper et al., 1996]. De plus, cette approche constitue le moyen le plus sûr d'identifier les épitopes effectivement présents à la surface des cellules tumorales.

Stratégie prédictive Cette stratégie consiste à déterminer au sein de la séquence de protéines connues pour être surexprimées ou mutées dans les cellules tumorales les peptides présentant les résidus d'ancrage appropriés pour un CMH rencontré fréquemment dans la population. Ces peptides sont ensuite utilisés pour stimuler des lymphocytes T in vitro [Celis et al., 1994]. Les peptides antigéniques identifiés sont donc en théorie susceptibles d'induire des lymphocytes T réactifs vis-à-vis des cellules tumorales. Dans un bon nombre de cas, les CTL induits par les peptides identifiés ont été incapables de reconnaître efficacement les cellules tumorales [Zaks and Rosenberg, 1998, Ayyoub et al., 1999]. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce paradoxe. D'une part, les CTL induits in vitro par de fortes concentrations de peptides sont de faible avidité et incapables de reconnaître les faibles quantités d'antigènes exprimés à la surface des cellules tumorales [Dahl et al., 1996]. D'autre part, les modifications post-traductionnelles dans la cellule tumorale conduisent à la présentation d'antigènes différents de ceux initialement prédits [Skipper et al., 1996]. Enfin dans certains cas, les peptides identifiés subissent une maturation par le protéasome qui ne produit pas le peptide antigénique dans une forme optimale pour la présentation par le CMH [Morel et al., 2000, Kessler et al., 2001]. Deux approches différentes ont permis de franchir ces obstacles. La première approche consiste en l'induction de CTL spécifiques par des DC transfectées par les gènes d'intérêt. Dans ce cas, les lympho-

cytes T induits sont spécifiques de l'antigène efficacement présenté et sont utilisés pour identifier la séquence peptidique correspondante [Chaux et al., 1999]. Dans la seconde approche, la maturation correcte des épitopes prédits est recherchée par des digestions *in vitro* par le protéasome de peptides précurseurs [Kessler et al., 2001]. Ces deux approches ont permis d'améliorer l'efficacité des approches prédictives.

Approche sérologique (SEREX) L'approche sérologique constitue un outil puissant pour identifier les antigènes tumoraux qui sont spontanément immunogènes. Cette méthode SEREX est basée sur l'analyse sérologique des produits d'expression d'ADNc préparés à partir d'ARNm extraits de cellules tumorales d'un patient. Les produits codés par les séquences codantes de la banque sont exprimés par *E.coli*. L'immunoréactivité de ces produits d'expression est démontrée par les anticorps contenus dans le sérum du patient duquel les cellules tumorales sont extraites. Le résultat révèle l'ensemble des antigènes tumoraux exprimés par la tumeur induisant une réaction immunitaire humorale comme l'antigène SSX-2. D'autres antigènes identifiés comme la tyrosinase, MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO 1 sont reconnus par la présence d'anticorps mais aussi par les CTLs. Pfreundschuh et al. ont été les premiers à utiliser le sérum de patients atteints de lésions cancéreuses pour identifier les antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes B [Pfreundschuh, 2000, Preuss et al., 2002]. Cette méthode d'identification présente l'inconvénient de n'être utilisable que dans le cas de titre élevé en anticorps [Chouaib et al., 2001].

Identification d'antigènes restreints au HLA-II Les antigènes tumoraux restreints au HLA-II sont également importants et ont été décrits plus récemment. À la différence des antigènes restreints au HLA I, la transfection des banques d'ADNc dans des cellules de cible n'est pas une technique utile pour la détection des antigènes de HLA II, car des protéines traduites ne sont pas habituellement traitées par la voie de HLA II. Cependant, Wang et ses collègues [Wang et al., 1999c] ont décrit une technique concernant le criblage des banques d'ADNc fusionnés avec le gène qui code la séquence de la chaîne invariante (Ii), conçus pour guider les protéines codée dans la voie de HLA-II. Plusieurs classes d'antigènes restreints au HLA-II, reconnues par des lymphocytes T CD4, ont été décrites (passé en revue dans [Rosenberg, 2001]).

2.3.2 Classification des antigènes tumoraux

La classification des antigènes proposée est basée sur la nature de leur expression [Jager et al., 2000]. Elle est décrite par Tab. 2.1.

2.3.2.1 Les antigènes spécifiques du patient

Les cellules tumorales sont le siège d'un nombre important de mutations génétiques survenant au hasard ou bien consécutive au processus de tumorigenèse. Ces mutations témoignent de l'instabilité génétique des cellules tumorales. Des protéines ubiquitaires peuvent donc être mutées dans les cellules tumorales, et générer de nouveaux antigènes spécifiques des tumeurs. Les antigènes de cette catégorie ont été identifiés au niveau de la séquence de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (CDK4) [Wolfel et al., 1995], le contrôle de la prolifération (β -catenine) [Robbins and Kawakami, 1996] ou l'induction d'apoptose (CASP-8) [Mandelboim and Berke, 1994]. Certaines mutations au niveau des produits du proto-oncogène ras ou du gène suppresseur de tumeurs p53 sont reconnues par des lymphocytes T CD4+ et CD8+ [Gedde-Dahl et al., 1992, Theobald et al., 1995, Gjertsen et al., 2001]. Les antigènes dérivés des protéines mutées ras ou p53 sont particulièrement intéressants, car les mutations retrouvées au niveau de ces oncogènes sont communes à plusieurs types de cancer.

Les antigènes issus de mutations pourraient être des candidats intéressants pour l'immunothérapie. En effet, ils sont exprimés spécifiquement dans les cellules tumorales, et le répertoire de cellules T réactif vis-à-vis de ces antigènes n'est pas restreint par la tolérance au soi. Néanmoins, l'utilisation de cette catégorie d'antigènes en immunothérapie nécessite l'identification de la protéine mutée ou la mise en évidence de la présence de l'antigène viral au niveau de la tumeur de chaque individu, afin de mettre en place un traitement personnalisé. Cette limitation exclut les antigènes de cette catégorie en ce qui concerne l'élaboration d'un vaccin antitumoral à grande échelle.

2.3.2.2 Les antigènes spécifiques de tumeurs

La plupart de ces antigènes ont été caractérisés par une approche génétique ou sérologique. Ils sont codés par des gènes complètement silencieux dans la plupart des tissus normaux et sont activés dans un grand nombre de tumeurs de type histologique

| Gène/Protéine | Tumeur | Référence |
|--|---|----------------------------------|
| antigènes spécifiques du patient (des antigènes mutés ou protéines de transcrits de fusion) | | |
| MUM-1 | mélanome | [Coulie et al., 1995] |
| CDK4 | mélanome | [Wolfel et al., 1995] |
| β -catenine | mélanome | [Rubinfeld et al., 1997] |
| HLA-A2 | carcinome rénal | [Brandle et al., 1996] |
| Bcr-abl | leucémie myéloïde | [Bosch et al., 1996] |
| CASP-8 | carcinome de la tête et du cou | [Mandruzzato et al., 1997] |
| p53 | cancer colorectal, de la vessie, de l'estomac | [Gnjatic et al., 1998] |
| antigènes spécifiques de tumeur (cancer-testis antigens) | | |
| MAGE 1 | mélanome | [Traversari et al., 1992] |
| MAGE 3 | mélanome | [van der Bruggen et al., 1994] |
| MAGE 6 | mélanome | [Zorn and Hercend, 1999] |
| BAGE | mélanome | [Boel et al., 1995] |
| GAGE | mélanome | [Russo et al., 1996] |
| RAGE | mélanome | [Pellat-Deceunynck et al., 2000] |
| PRAME | mélanome | [Ikeda et al., 1999] |
| NY ESO1 | mélanome | [Valmori et al., 2000] |
| CEA | carcinome colorectal | [Tsang et al., 1995] |
| antigènes de différenciation | | |
| tyrosinase | mélanome | [Kawakami et al., 1998] |
| gp-100 | mélanome | [Skipper et al., 1996] |
| Melan-A/mart-1 | mélanome | [Kawakami et al., 1994] |
| thyroglobuline | cancer de la thyroïde | [Fong and Engleman, 2000] |
| α -fetoprotéine | cancer du foie | [Fong and Engleman, 2000] |
| antigènes surexprimés | | |
| gp75 | mélanome | [Neumann et al., 1998] |
| PSA | cancer de la prostate | [Correale et al., 1997] |
| PMSA | cancer de la prostate | [Fong and Engleman, 2000] |
| HER-2/neu | cancer du sein, de l'ovaire et colo-rectal | [Fisk et al., 1995] |
| p53 | cancer colorectal, de la vessie, de l'estomac | [Gnjatic et al., 1998] |
| antigènes viraux | | |
| EBV | lymphome de Burkitt | [Moss et al., 1999] |
| HPV | cancer du col de l'utérus | [Ressing et al., 1995] |

TAB. 2.1: Antigènes tumoraux humains

divers. Les seules cellules normales identifiées, exprimant en quantité significative les produits de ces gènes, sont les cellules germinales. Pour le système immunitaire, ces protéines sont spécifiques de tumeur. Ces antigènes sont aussi appelés les antigènes “Cancer/testis” (CT). Aujourd’hui, 44 gènes ou familles de gènes ont été identifiés, comptant plus de 89 antigènes au total. Leur classification et la nomenclature appliquée à cette classification sont décrites par Tab. 2.1. Les antigènes sont groupés en superfamilles (MAGE) puis familles (MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C) mais peuvent aussi être isolés (BAGE). A la différence des antigènes codés par des gènes mutés ou par des antigènes viraux, ils représentent les antigènes les plus spécifiques de tumeurs découverts à ce jour. Par conséquent, les antigènes spécifiques de tumeurs sont des candidats privilégiés pour le développement de l’immunothérapie antitumorale. L’expression des antigènes communs au niveau des testicules ou au niveau de la rétine n’est pas limitant pour leur utilisation en immunothérapie, dans la mesure où ces tissus n’expriment pas ou peu de CMH-I [Uyttenhove et al., 2003].

2.3.2.3 Les antigènes non mutés surexprimés dans les cellules tumorales

Ces antigènes sont ubiquitaires, mais surexprimés spécifiquement dans un nombre important de cellules tumorales d’origines variées. Contrairement aux gènes de la famille MAGE, les antigènes de cette catégorie sont exprimés dans les cellules normales, mais à des niveaux particulièrement faibles. Pour cette raison, les CTL spécifiques de ces antigènes reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales mais pas les cellules saines. En effet, un seuil d’expression minimal de l’antigène semble être nécessaire à la reconnaissance par les CTL [Lethe et al., 1998]. Un antigène typique de cette catégorie est le gène HER-2/neu exprimé dans les tissus normaux et surexprimé dans environ 30% des cancers du sein et de l’ovaire [Pauletti et al., 1996, Press et al., 1997]. Un peptide dérivé du gène HER-2/neu est reconnu efficacement par des lymphocytes infiltrant un carcinome ovarien [Fisk et al., 1995]. Les premiers essais cliniques utilisant un peptide dérivé du gène HER-2/neu montrent que les CTL spécifiques de l’antigène, induits après vaccination, ne reconnaissent pas les cellules normales, mais ne lysent pas non plus les tumorales [Zaks and Rosenberg, 1998]. Récemment, des antigènes ont été identifiés, par une approche prédictive, au sein du gène de la télomérase (hTERT) surexprimé dans plus de 85% des cancers [Vonderheide et al., 1999].

Les CTL induits *in vitro* à partir des peptides identifiés reconnaissent et lysent les cellules tumorales [Vonderheide et al., 1999, Ayyoub et al., 2001]. L'induction d'une réponse immunitaire chez la souris vaccinée contre l'analogue murin de l'antigène de la télomérase n'induit pas de réaction auto-immune au niveau des tissus sains, comme les cellules de la moelle osseuse ou du foie, exprimant le gène TERT [Nair et al., 2000]. De plus, les CTL spécifiques de l'antigène TERT sont capables de reconnaître des cellules tumorales de types histologiques différents et les souris vaccinées sont partiellement protégées vis-à-vis de l'inoculation de trois modèles différents de tumeurs [Nair et al., 2000]. Ces résultats intéressants pourraient permettre d'envisager à partir de cette catégorie d'antigènes une immunothérapie applicable à de nombreux types de cancers d'origines histologiques variées. L'expression ubiquitaire de ce type d'antigènes implique un suivi attentif d'éventuelles réactions auto-immunes en cas d'utilisation en immunothérapie.

2.3.2.4 Les antigènes de différenciation

Les antigènes de différenciation reconnus par les CTLs ne sont pas spécifiques de tumeur. Ils correspondent aux protéines de différenciation exprimées par les cellules somatiques à l'origine de la tumeur. Dans le cas du mélanome, les lymphocytes cytotoxiques spécifiques de la tumeur reconnaissent également les mélanocytes.

Des travaux précédents avaient associé la dépigmentation de la peau par la destruction des mélanocytes sains (vitiligo) avec une régression tumorale et une amélioration du pronostic clinique de patients atteints du mélanome [Duhra and Ilchysyn, 1991]. Les antigènes de différenciation mélanocytaire exprimés à la fois par les cellules tumorales et les cellules saines sont souvent reconnus par des TILs [Kawakami et al., 1995]. Ces données ont mis en évidence l'existence d'une rupture de la tolérance immunitaire aux antigènes de différenciation et le développement d'une réponse auto-immune contre ces antigènes du soi chez des patients atteints du mélanome. Des études ont montré que des lymphocytes précurseurs réactifs vis-à-vis des antigènes dérivés de la tyrosinase ou de Melan-A/MART-1 sont présents chez des donneurs sains [van Elsas et al., 1996, Visseren et al., 1997, Pittet et al., 2001]. L'induction d'une rupture de tolérance immunitaire rend les antigènes de cette catégorie particulièrement intéressants pour une immunothérapie du mélanome. En effet, dans ce cas particulier, les

conséquences de l'induction d'une réponse auto-immune demeurent limitées à une dépigmentation de la peau. De nombreux essais cliniques utilisant différents protocoles de vaccination incluant des antigènes de différenciation montrent la possibilité de l'induction d'une auto-immunité contre les mélanocytes et les mélanomes spécifiques de l'antigène vaccinal [Jaeger et al., 1996, Rosenberg et al., 1998, Scheibenbogen et al., 2000].

2.3.2.5 Les antigènes viraux

Les tumeurs associées aux virus expriment des antigènes viraux identiques entre différentes tumeurs. Ces antigènes sont des cibles thérapeutiques potentielles. C'est le cas des cancers génitaux associés aux papillomavirus. La protéine E7 exprimée initialement par la souche 16 du virus est impliquée dans la transformation tumorale des cellules cervicales. Des lymphocytes T spécifiques de peptides dérivés de cette protéine et restreints aux molécules de HLA-A2 ont été détectés après stimulation *in vitro* [Ressing et al., 1995]. Le deuxième exemple concerne le virus d'Epstein Barr. Il sévit essentiellement pendant l'enfance. La primo-infection le plus souvent lors de l'adolescence est soit asymptomatique soit caractérisée par une forte mononucléose. Le virus persiste dans l'organisme sous le contrôle puissant du système immunitaire impliquant des CTLs spécifiques des protéines du virus. Il suffit simplement d'une déficience temporaire du système immunitaire pour que les patients immunodéprimés développent un lymphome immunoblastique. La régression tumorale n'apparaît qu'avec la reprise d'un fonctionnement normal du système immunitaire. Cette régression peut être accélérée par traitement avec des CTLs spécifiques du virus Epstein Barr [Steven et al., 1997]. En revanche, certaines tumeurs peuvent échapper au contrôle du système immunitaire parce qu'elles perdent l'expression des protéines immunogènes du virus. La seule protéine virale alors exprimée et essentielle à la maintenance du virus latent est EBNA-1. Elle présente la particularité de ne pas générer de peptide et donc de ne pas être immunogène. En effet, la protéine comprend un domaine structural qui inhibe l'action du protéasome et ainsi empêche son apprêtage et sa présentation par les molécules de CMH à la surface de la cellule [Sugden and Warren, 1989].

2.3.3 Échappement des tumeurs aux réactions immunes

Les cellules tumorales échappent fréquemment au contrôle du système immunitaire. Les mécanismes de résistance développés par la tumeur sont multiples et peuvent se cumuler. Ils peuvent être regroupés en deux grandes catégories :

1. Résistance des cellules malignes aux effecteurs immuns. En réponse à la pression de sélection du système immunitaire ou spontanément, les cellules tumorales peuvent élaborer des moyens les rendant invulnérables à l'égard du système immunitaire, soit par une stratégie d'évasion soit par une stratégie de contre-attaque [Villunger and Strasser, 1999].
2. Réponse immunitaire inexistante ou inefficace. Le système immunitaire peut demeurer ou devenir tolérant face à une tumeur, par indifférence, anergie ou développement d'une tolérance active.

2.3.3.1 Résistance tumorale aux effecteurs immuns

Altération d'expression des molécules HLA I Toute action des lymphocytes T cytotoxiques dépend de l'expression et de la fonction des molécules HLA I. L'instabilité génétique propre aux cellules cancéreuses peut provoquer la perte de l'expression des molécules HLA I. Le déficit d'expression de ces molécules, présentatrices des peptides antigéniques dérivés des antigènes tumoraux, a pour conséquence l'échappement des cellules tumorales au contrôle du système immunitaire. Ce déficit est un phénomène général très en documenté pour différentes tumeurs. Les mécanismes liés à cette perte d'expression peuvent être multiples, ils peuvent trouver leur origine dans une mutation ou une délétion de la β 2-microglobuline qui est indispensable pour à l'expression des molécules du HLA-I [Bicknell et al., 1994]. Il peut exister aussi une absence des molécules TAP, qui assurent transport des peptides du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique où les peptides peuvent s'associer aux molécules de HLA. Quand il y a des mutations dans TAP1 ou TAP2, les molécules du HLA I dans le RE sont instables et sont éventuellement dirigées vers le cytosol, où elles sont dégradées [Chen et al., 1996].

Insensibilité ou échappement à l'apoptose La résistance à l'apoptose naturelle est un phénomène inhérent au processus tumoral. Les mécanismes par lesquels une

tumeur assure sa survie en résistant à l'apoptose sont multiples et peuvent se cumuler. On distinguera :

- La surexpression de protéines anti-apoptotiques. Comme la survivine regroupées dans la famille des IAPs sont inhibitrices des caspases.
- La diminution ou la mutation de molécules pro-apoptotiques. De nombreuses molécules de la voie extrinsèque ou intrinsèque peuvent être impliquées comme BAX, la caspase 8, CD95 ou TRAIL.
- La dérégulation de la voie p53.
- La résistance à l'action des lymphocytes cytotoxiques il a été démontré que différentes tumeurs exprimaient la molécule FasL. Par ce moyen, les cellules cancéreuses induisent l'apoptose des lymphocytes T et NK infiltrant la tumeur [Frost et al., 1997].

Stratégie de contre-attaque Les cellules malignes peuvent détruire ou inactiver les cellules effectrices, par la sécrétion des molécules solubles (des cytokines ou des récepteurs solubles) ou par des contacts cellulaires directs [Costello et al., 1999]. La meilleure illustration de ce phénomène est « contre-attaque de Fas ». Brièvement, la molécule Fas, une fois stimulée par son ligand (FasL), induit un message d'apoptose cellulaire. La molécule Fas est exprimée par beaucoup de cellules, en particulier par des lymphocytes T. Une expression d'un FasL fonctionnel par des cellules tumorales est fréquente dans le carcinome colique, les tumeurs hépatiques, le mélanome ou les lymphomes. En conséquence, des TILs peuvent être détruits par apoptose, tandis que la tumeur elle-même est souvent au moins partiellement résistante à l'apoptose dépendant de Fas. Des niveaux circulants très élevés de FasL soluble dans certaines malignités hématologiques telles que le lymphome de grand lymphocyte granulaire ou le lymphome de NK a été démontrée [Costello et al., 1999].

2.3.3.2 Réponse immune inexistante ou inefficace

La première raison potentielle d'une absence de réponse immunitaire est l'ignorance de l'antigène par le système immune. Le système immunitaire peut être incapable de détecter les antigènes tumoraux pour plusieurs raisons. La tumeur en restant confinée dans un tissu périphérique est très peu accessible aux cellules immunes. L'équipe de Zinkernagel a démontré que l'immunogénicité de tumeurs expé-

rimentales diverses, implantées sous la peau sous forme de cellules en suspension, est plus forte que l'immunogénicité de tumeurs implantées sous la forme de tumeurs compactes [Ochsenbein et al., 2001]. Même parvenues dans les organes lymphoïdes, les cellules tumorales peuvent demeurer ignorées du système immunitaire. Elles sont isolées derrière une barrière moléculaire, de fibres de collagènes ou de facteurs de coagulation. En outre, les tumeurs qui se développent dans des sites privilégiés d'immunité comme le cerveau et les yeux sont peu accessibles au système immunitaire. La régulation négative des molécules d'adhésion dans les tissus malins peut inhiber l'infiltration immune et donc contribuer à l'ignorance immunitaire [Igney and Krammer, 2002]. La dose d'antigène est un facteur important du déclenchement de la réponse immunitaire. Une dose d'antigène insuffisante mobilisant un nombre d'effecteurs trop faible peut être aussi la raison de l'ignorance immunitaire.

La deuxième raison d'inefficacité démontrée est l'absence des signaux de danger. Dans ce cas, la résultante de la stimulation du système immunitaire se traduit par un état de tolérance. Cette tolérance est le résultat soit d'une anergie soit d'une élimination clonale. C'est à cette étape que les cellules dendritiques jouent un rôle pivot pour transmettre l'information antigénique immunogène ou tolérogène aux lymphocytes T. L'existence de lymphocytes T CD8+, spécifiques d'antigènes portés par une tumeur, présents en quantité normale mais inefficaces a été montrée chez un grand nombre de cas de patients. Tout le problème des stratégies vaccinales est de pouvoir rompre cet état de tolérance ou de réactivité insuffisante [Engelhard et al., 2002].

En conclusion, l'échappement tumoral est un paramètre dont il faut tenir compte pour la mise en place d'une stratégie de vaccination. L'échappement constitue un obstacle à l'efficacité de la thérapie cellulaire. L'analyse des résultats des études cliniques montre l'efficacité partielle des vaccinations. L'échantillonnage des patients participant aux études cliniques est réalisé parmi une population atteinte de cancer avancé. La probabilité que la tumeur ait mis en place un mécanisme d'échappement est plus grande à ce stade avancé de la maladie. Une thérapie cellulaire adoptée dès le développement de la tumeur avant l'installation des mécanismes d'échappement devrait s'avérer plus efficace, mais ceci reste à démontrer.

Chapitre 3

Vaccination antitumorale

Les vaccins contre le cancer sont basés sur le principe que le système immunitaire peut être stimulé de manière à produire des réponses immunes contre les cellules tumorales. Bien que les vaccins aient été utilisés depuis plus d'un siècle avec succès, la vaccination antitumorale est confrontée à des défis particuliers et propres au cancer. Les cellules tumorales induisent généralement des réponses faibles et sont considérées comme peu immunogéniques probablement en raison de leur appartenance au soi. De plus, chez les patients atteints de cancer, les cellules tumorales ont été exposées au système immunitaire et peuvent avoir induit un état de tolérance chez l'hôte. La vaccination antitumorale apparaît donc comme un défi difficile à réaliser car elle doit faire face à une faible immunogénicité des vaccins et à un possible état de tolérance des patients.

A ce jour, différentes formes de vaccins ont été développées et testées dans les essais cliniques. Dans ce chapitre, les stratégies vaccinales principales ont été répertoriées en 6 catégories basées sur la forme de vaccin administré : (1) vaccins à base de peptides ; (2) vaccins à base de protéines ; (3) vaccins à base de vecteurs viraux ; (4) vaccins à base d'ADN ; (5) vaccins à base de cellules et (6) vaccins à base d'autres stratégies. Mon travail s'inscrit dans le développement de vaccins à base de peptides.

3.1 Vaccins à base de peptides

L'identification des antigènes tumoraux a significativement avancé le développement des vaccins anti-tumoraux. La compréhension de la reconnaissance des antigènes

a eu comme conséquence le développement des vaccins spécifiques des tumeurs basés sur des peptides liants les molécules de HLA I ou II et reconnus par les lymphocytes T CD8+ et CD4+. Il s'agit d'une stratégie vaccinale basée sur les épitopes. L'utilisation des peptides synthétiques offre des avantages pratiques tels que la facilité relative de synthèse, la stabilité chimique, et l'absence de risque infectieux ou oncogène. Les peptides peuvent également permettre une meilleure manipulation de la réponse immune par l'utilisation des épitopes conçus pour stimuler les sous populations particulières de cellules T. D'une manière plus importante, les vaccins peptidiques peuvent induire des réponses immunitaires contre des parties définies d'antigènes.

Il existe différentes sortes d'épitopes T. L'immunisation contre des protéines étrangères entières induit une réponse immunitaire qui ne cible qu'une partie des épitopes. Ces épitopes sont les épitopes dominants. D'autres épitopes, sous-dominants ou cryptiques, sont également capables d'induire une réponse immunitaire mais ils ne participent en règle pas à la réponse contre la protéine entière. Contrairement aux épitopes dominants, les épitopes cryptiques ou sous dominants ne sont pas sujets à la tolérance induite par les cellules tumorales. Il a été montré qu'ils peuvent donner naissance à des réponses intenses et protectrices contre les tumeurs. Ces réponses peuvent être obtenues avec des peptides.

L'approche vaccinale à base de peptides implique plusieurs étapes importantes qui consistent premièrement à identifier les peptides appropriés, deuxièmement à étudier leur immunogénicité *in vitro* et à formuler un produit sûr à employer dans les essais cliniques, troisièmement à améliorer éventuellement l'immunogénicité de peptides.

3.1.1 Identification de peptides appropriés

3.1.1.1 Méthode d'élution de peptides naturellement présentés

Une stratégie employée pour identifier les peptides appropriés est basée sur l'identification de peptides naturellement présentés par les molécules de HLA I et HLA II sur des cellules tumorales. Ces peptides ont été isolés par élution acide des molécules de HLA purifiées par immunoaffinité et séquencés. Leur séquence permet de remonter à la protéine qu'il leur a donné naissance et qui constitue l'antigène tumoral. Les approches alternatives sont d'obtenir les peptides en détruisant mécaniquement et traitant à l'acide des cellules tumorales entières et/ou en exposant les cellules tu-

morales vivantes à un rapide traitement acide [Bocchia et al., 2000]. L'inconvénient principal de cette approche est que beaucoup de cellules tumorales expriment des niveaux bas des molécules de HLA et le rendement de peptides peut être faible. De plus l'élution de peptides est un travail intensif qui exige beaucoup de techniques, aussi que des instruments très sensibles pour séquencer les peptides élués. Néanmoins quelques peptides immunogènes (classe I ou classe II) ont été identifiés par ces dernières méthodes. Et sont issus de la protéine sauvage p53, de l'antigène associé de mélanome MART-1 et de la protéine gp100 [Berger et al., 2002].

3.1.1.2 Méthode algorithmique

Plusieurs algorithmes ont été développés pour prédire des motifs de peptides pour les molécules de HLA-I et HLA-II. Les algorithmes actuellement utilisés sont basés soit sur les motifs de liaison, soit sur les matrices quantitative, soit sur les réseaux neuronaux ANN (*artificial neural network*). Hassainya et al. [Hassainya et al., 2005] ont employé deux algorithmes « BIMAS » et « SYFPEITHI » combinés aux données de la digestion par le complexe du protéasome pour identifier les épitopes dérivés de la pro-insuline, un auto-antigène probablement jouant un rôle important dans la pathogenesis du diabète de type 1. « SYFPEITHI », le premier algorithme de prédiction d'épitopes de HLA I a été basé sur l'identification de résidus d'ancrage par Rammensee et al. [Rammensee et al., 1999]. « BIMAS » a été développé par K.C. Parker et ses collaborateurs [Parker et al., 1994]. Il classe les peptides potentiels selon le demi-temps de dissociation des complexes HLA I/peptide qu'il prédit. Dans l'étude de Hassainya, 10 peptides ont été sélectionnés, dont 7 peptides sont immunogènes dans la souris transgénique de HLA-A2. Finalement 6 peptides ont été mis en évidence qui sont naturellement apprêtés et présentés par des cellules exprimant la pro-insuline [Hassainya et al., 2005].

Pour prédire les épitopes HLA II, l'algorithme TEPITOPE développé plus récemment a montré son efficacité dans la prédiction d'épitopes T CD4+ présentés par plusieurs molécules HLA-DR [Sturniolo et al., 1999]. Le site de fixation de peptide de HLA II est un sillon composé de 5 positions spécifiques appelées poches. Chaque poche accepte un acide aminé d'un peptide. Par comparaison de séquences des allèles de HLA II, les auteurs ont trouvé qu'il y a un nombre limité de profils de polymor-

phisme pour une poche fixée. Les auteurs ont pu évaluer l'affinité de chaque type de poche pour chacun de 20 acides aminés, et, considérant l'interaction des acides aminés avec les 5 poches comme indépendantes évaluer l'affinité des peptides pour chaque forme allélique des molécules HLA II. L'utilisation de TEPITOPE permet de calculer les forces de liaison de tous peptides d'une protéine pour les 51 allèles de HLA II. Les peptides ayant les plus grandes forces de liaison seraient présumés pour être les epitopes immune-stimulants. Cette méthode basée sur matrice permet également l'identification des peptides promiscuitaire qui se lient à plusieurs formes allèles de HLA II et sont donc les candidats les plus prometteurs pour un vaccin. TEPITOPE a été appliqué à la recherche d'épitopes des antigènes tumoraux comme gp100 [Cochlovius et al., 2000], MAGE-A3 [Consogno et al., 2003], RAGE-1 [Stassar et al., 2001] etc, mais aussi dans des antigènes de maladies infectieuses comme HSV [BenMohamed et al., 2003], Mycobacterium tuberculosis [Panigada et al., 2002], etc.

Récemment nous nous sommes inspirés de TEPITOPE pour faire un programme de prédiction pour HLA-DP4 en utilisant des données obtenues par la caractérisation de fixation aux molécules HLA-DP4 [Castelli et al., 2002]. Ces résultats sont présentés dans le chapitre 6.

3.1.1.3 Méthode basée sur les TILs(tumor infiltrating lymphocytes)

Les TILs sont des lymphocytes infiltrant le stroma des nodules de cancer. Similaire à la méthode génétique pour identification d'antigènes tumoraux, cette approche consiste à induire des CTLs par la restimulation répétée in vitro de TILs avec les cellules tumorales autologues. Par transfection des cellules présentant un haplotype HLA approprié par des fragments du gène codant l'antigène, la région comportant l'épitope est localisée précisément. Finalement, des peptides correspondants à la région identifiée et possédant les résidus d'ancrage à la molécule HLA considérée sont synthétisés et testés pour leur capacité à sensibiliser des cellules cibles à la lyse par les CTLs [Boon et al., 1992, De Plaen et al., 1997]. La plupart des peptides dérivés de TIL identifiés sont restreints aux molécules HLA I, comme les peptides de gp100, MART-1, MAGE-A1 et MAGE-A3. Plus récemment des peptides de HLA II ont été identifiés par cette méthode, par exemple, les TILs CD4+ isolés de patients de cancer

cervical reconnaissent 2 peptides dérivés de la protéine E7 du HPV présentés par HLA-DR4 [Hohn et al., 1999]. Wang et al [Wang et al., 1999b] ont également identifié un nouvel antigène généré par réarrangement chromosomal et reconnu par des TIL CD4+. Ensuite 34 peptides correspondants la séquence identifiée ont été synthétisés et testés. Finalement 2 peptides ont été mis en évidence qu'ils sont reconnus par des TIL CD4+ restreints au HLA-DR1.

3.1.1.4 Autre méthode d'identification

Des peptides épitopiques restreints pour HLA II ont été identifiés par le criblage de librairie de peptides chevauchants dérivés de l'antigène étudié en utilisant les lymphocytes T humains. Les épitopes de l'antigène mélanome MAGE-A3 [Chaux et al., 1999], NY-ESO 1 [Jager et al., 2000], et l'antigène membranaire spécifique de prostate [Schroers et al., 2003] ont été identifiés par cette méthode. Dans le cas de NY-ESO 1, Jäger et al. [Jager et al., 2000] ont utilisé 28 peptides de 18-mer chevauchants pour détecter la réponse T CD4+ induites par les DCs immatures chargées de la protéine NY-ESO 1. Une production importante d'INF- γ a été stimulée par 3 peptides. De plus cette réaction a été totalement bloquée par l'ajout de l'anticorps anti-DR. C'est-à-dire que la reconnaissance de peptide est restreinte au HLA-DR. Finalement 2 peptides (P115-132, P139-156) ont été mis en évidence pour leur capacité d'induire des réponses cellules T CD4+ dans le contexte de HLA-DR4 capable de reconnaître la protéine native chez deux patients de mélanome. L'avantage de cette approche est que les résultats sont exhaustifs, couvrants la longueur entière de l'antigène. Un inconvénient significatif est le coût de construction de librairie de peptides chevauchants couvrant le totalité de l'antigène entier.

3.1.2 Les essais cliniques de vaccins peptidiques

Pendant la période de 1985 à 1998, beaucoup d'attention a été donnée au rôle des cellules T CD8+ parce que la plupart des tumeurs sont positives pour HLA I, mais négatives pour HLA II. De plus les CTLs peuvent lyser des cellules tumorales directement après la reconnaissance des complexes de HLA I/peptide exprimés par la tumeur. Leur capacité d'éradiquer la tumeur a été démontrée chez la souris [Mandelboim et al., 1995]. Aussi, une variété importante de peptides restreints aux molécules

HLA I ont été inclus dans différents vaccins, avec ou sans adjuvant et ont été testés chez des sujets atteints de cancer. Le modèle clinique le plus utilisé pour la vaccination peptidique est le mélanome malin. Les diverses méthodes immunologiques de suivi clinique utilisées sont listées dans le Tab. 3.1. Chacune a ses avantages et ses inconvénients, mais aucune n'a permis de dégager un marqueur immunologique corrélant avec la régression de tumeur [Berzofsky et al., 2004].

Les résultats de quelques essais cliniques sont récapitulés dans le Tab. 3.2. Parmi les études du mélanome montrées ici, seulement 4 études ont eu un taux de réponse supérieur à 20%. Une des meilleures réponses cliniques a été démontrée par Marchand et al. [Marchand et al., 1999]. Une réponse clinique a été observée dans 7/25(28%) patients atteints de mélanome métastatique et qui ont reçu trois injections sous-cutanées d'un nanopeptide de MAGE-A3 restreint à la molécule HLA-A1. Trois réponses étaient complètes, dont deux ont abouti à un état d'absence de symptômes pendant plus de 2 années. Cependant, la réponse des CTLs contre le peptide MAGE-A3.1 n'a pas été détectée chez aucun des quatre patients analysés (y compris ceux qui avaient des réponses cliniques complètes). De même, dans un essai clinique mené par l'équipe de Rosenberg, aucun CTL spécifiques du vaccin n'a été détecté dans le sang des patients de mélanome vaccinés par le peptide gp100 (209-2M), alors qu'une réponse clinique avait été observée [Rosenberg et al., 1998]. L'absence de réponse des cellules T dans le sang des patients vaccinés semble indiquer que la réponse produite contre le peptide est faible. Comme une régression est observée il est possible que les effecteurs cytotoxiques se soient concentrés dans les tumeurs. Pierre Coulie a récemment montré que le vaccin peptidique augmente le nombre de cellules T spécifiques à des niveaux non détectables ex vivo mais surtout augmente le nombre de cellules T spécifiques de l'ensemble de la tumeur. Une grande partie de ces CTLs sont spécifiques d'un autre antigène tumoral appelé MAGE-C2 (communication du Dr P Coulie, European Congress of Immunology 2006). Enfin il est à noter malheureusement que des études montrent qu'une forte réponse de CTLs in vitro des lymphocytes périphériques de sang (PBLs) des patients vaccinés n'est pas nécessairement associée à une réponse clinique [Parmiani et al., 2003].

En plus du mélanome, la vaccination peptidique a été aussi utilisée dans d'autres cancers, comme les cancers pancréatiques et du col de l'utérus. Les peptides utilisés comme vaccins sont issus de la protéine oncogène KRas, connue pour être mutée dans

| Essai | Avantages | Inconvénients | Sensibilité |
|--------------------|---|---|---------------------|
| Prolifération | techniquement simple | Incapable d'énumérer les cellules spécifiques; mesures principalement les cellules T CD4, pas CD8 | - |
| Tétramère | Capable d'énumérer les cellules T spécifiques; analyse possible de sous-population | Requiert la synthèse des tétramères spécifiques; pas une mesure d'activité fonctionnelle; limité pour un seul epitope | $1 : 10^4$ |
| Cytométrie de flux | Capable d'énumérer les cellules T spécifiques; essai fonctionnel; analyse possible de sous-population | Requiert l'incubation; incapable d'obtenir les cellules vivantes après essai; technique compliquée | $1 : 5 \times 10^4$ |
| ELISA | essai fonctionnel | Aucune information phénotypique sur les cellules répondeuse; incapable d'énumérer les cellules spécifiques | - |
| ELISPOT | Capable d'énumérer les cellules T spécifiques; essai fonctionnel | Aucune information phénotypique sur les cellules répondeuse | $1 : 10^5$ |
| Cytotoxicité | Essai fonctionnel; quantification relative de cellules | Requiert la tumeur/cibles autologues; stimulations in vitro requis; incapable d'énumérer les cellules spécifiques | - |
| RT-PCR | Réactifs universels; mesure indirecte de fonction | Mesure le mRNA, pas protéine; incapable d'énumérer les cellules spécifiques; exige plusieurs étapes (longues) | $1 : 10^5$ |
| Dilution limite | Capable d'énumérer les cellules T spécifiques; essai fonctionnel | travail intensif; requiert des stimulations multiples; détecte seulement les cellules qui peuvent proliférer | $1 : 10^5$ |

TAB. 3.1: méthodes immunologiques de suivi clinique

90% des cancers pancréatiques, et du HPV exprimé dans le carcinome intraépithelial cervical de l'utérus(CIN). Ces résultats montrés aussi dans Tab. 3.2 semblent prometteurs, puisque les auteurs ont observé une survie globale augmentée dans le cancer pancréatique et un taux de réponse de 50% dans les CIN [Parmiani et al., 2003].

En raison de la mise en évidence du rôle des lymphocytes T CD4+ dans le contrôle de l'expansion tumorale, des efforts importants ont été faits pour identifier des épitopes T CD4+ dans différents antigènes comme MAGE-A, HER-2/neu et NY-ESO 1. Certains épitopes T CD4+ identifiés ont été combinés dans des vaccins comportant des épitopes T CD8+. Par exemple, un épitope T CD4+ putatif de HER-2/neu p369-384 comprenant un épitope p369-377 de HLA-A2 a été injecté avec du GM-CSF et testé chez 19 patients HLA-A2 et HER2/neu positifs. 62% des patients ont développé des réponses de lymphocytes T CD4+ et CD8+. Les CTLs sont capables de lyser les cellules tumorales. Les réponses vis à vis de p369-377 sont de longue durée et détectables chez les patients un an après la vaccination [Knutson et al., 2001]. Ces résultats montrent que l'épitope T CD4+ est vraiment capable d'aider à l'induction des réponses T CD8+ et de les maintenir sur une longue durée. Plusieurs groupes se concentrent sur l'identification des peptides qui sont capables à la fois de se lier aux molécules HLA II et contiennent les épitopes de HLA I du même antigène. Un peptide (p157-170) porteurs d'épitopes T restreints aux molécules HLA I et II a été identifié dans l'antigène NY-ESO 1. De même 3 peptides de gp100 ont été également trouvés [Berger et al., 2002]. Même sans vaccination concomitante avec des peptides CD8+, la stimulation d'une réponse efficace des cellules T CD4+ est une manière d'amplifier l'immunité spécifique des antigènes tumoraux car les cellules T CD4+ produisent dans le microenvironnement des cytokines nécessaires au maintien d'une réponse immunitaire.

3.1.3 Amélioration de l'immunogénicité d'épitopes

Les premiers essais cliniques sur des vaccins peptidiques ont indiqué que les patients peuvent être immunisés, mais les réponses immunes sont souvent insuffisantes pour induire une régression des tumeurs. La plupart des réponses des cellules T exigent pour être mise en évidence des stimulations *in vitro* répétées avec les épitopes. La nécessité d'étape de restimulations *in vitro* montrent que l'immunogénicité des vaccins

| Tumour | Peptide vaccine | Adjuvant | No. of patients | Clinical response | % | Réf. |
|---------------------|-------------------------------------|---------------------|-----------------|-------------------|----|------------------------------|
| Melanoma | Gp100(209)-2M | IFA+IL-2 | 31 | 1 CR, 12 PR | 42 | [Rosenberg et al., 1998] |
| | MART-127-35 | IFA | 18 | 1 PR | 5 | [Cormier et al., 1997] |
| | Gp100+MART-127-35+tyrosinase | GM-CSF or IL-12 | 51 | 5 CR, 6 PR | 21 | - ^a |
| | Gp100 | IFA+IL-12 or GM-CSF | 27 | 0 | 0 | [Rosenberg et al., 1999] |
| | MART-127-35 | IFA | 25 | >DFS | NA | [Wang et al., 1999a] |
| | Gp100(210M) +tyrosinase | IFA ± IL-12 | 48 | >DFS | NA | [Lee et al., 2001] |
| | MAGE-3.A1 | None | 25 | 3 CR, 4 PR | 28 | [Marchand et al., 1999] |
| | Tyrosinase | GM-CSF | 18 | 0 | 0 | [Scheibenbogen et al., 2000] |
| Melanoma and others | HSPPC-96 | None | 28 | 2 CR, 3 SD | - | [Belli et al., 2002] |
| | NY-ESO-1 | ± GM-CSF | 12 | 3 SD | 25 | [Jager et al., 2000] |
| Pancreatic cancer | K-Ras/12 | GM-CSF | 48 | >OS | NA | [Gjersten et al., 2001] |
| CIN | HPV-16/E7 +KSS-PADRE | IFA | 18 | 3 CR, 6 PR | 50 | [Muderspach et al., 2000] |
| CML | P210 +molgramostim | QS-21 | 16 | 7 CR | 44 | [Bocchia et al., 2005] |

CIN, cervical intraepithelial neoplasia ; CML, chronic myeloid leukemia ; CR, complete response ; DFS, disease-free survival ; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; IFA, incomplete Freund's adjuvant ; NA, not applicable ; PR, partial response ; SD, stable disease.

^a Personal communication by Dr Alexander Knuth (Department of Medical Oncology, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt, Germany).

TAB. 3.2: Vaccinations peptidiques : essais de phase I/II

peptidiques est faibles. C'est pourquoi, des études récentes se sont concentrées sur l'amélioration de l'immunogénicité des peptides. Les stratégies utilisées reposent sur les trois considérations principales : 1) la modification de la séquence peptidique ; 2) l'adjuvant ; et 3) la dose administrée du peptide.

La modification de séquences en acide aminé des peptides améliore l'efficacité des vaccins par plusieurs moyens [Berzofsky et al., 2004] : (a) augmenter l'affinité de peptide pour les molécules de HLA ; (b) augmenter les signaux d'activation par le TCR ; (c) inhiber la protéolyse du peptide par les peptidases du sérum. Chaque fois que la séquence du peptide est changée, il est important de démontrer que les cellules T induites reconnaissent toujours la séquence native du peptide. Plusieurs peptides modifiés de gp100 peuvent se lier avec une plus grande affinité à HLA-A*0201 que les peptides natifs et sont capables d'être reconnus par les TILs spécifiques d'épitopes natifs. Les peptides natifs et modifiés ont été employés pour sensibiliser des PBL de patients atteints de mélanome. Après cinq restimulations hebdomadaires, les peptides natifs n'ont réussi à induire des CTLs que chez une fraction des patients étudiés. Au contraire, les peptides modifiés ont pu induire les CTLs chez tous les patients [Parkhurst et al., 1996]. Dans le travail dirigé par Kosmatopoulos [Graff-Dubois et al., 2002], pour trouver des épitopes communs de MAGE-A susceptibles d'induire une réponse CTL restreint à HLA-A*0201, des peptides possibles de partager une même antigénicité ont été sélectionnés, même si certains manquent les résidus d'ancrage pour la molécule HLA-A*0201. Des modifications de séquence ont été introduites dans certains peptides pour améliorer la capacité de liaison et leur immunogénicité. Finalement un peptide hétéroclitique (p248V9) de haute affinité a été mis en évidence. Ce peptide correspond deux peptides dérivés de MAGE-A2, -A3, -A4, -A6, -A10, -A12 (p248G9) et MAGE-A1 (p248D9) qui sont restreints au HLA-A*0201. Il a restimulé des CTLs qui ont reconnu chaque MAGE-A et des cellules tumorales qui expriment les MAGE-A. L'équipe de Romero a aussi contribué substantiellement à ce type de recherche. Par exemple, un acide aminé a été introduit dans la position 2 du peptide Melan-A 26-35 (EAAGIGILTV) pour améliorer l'affinité du peptide avec la molécule HLA-A*0201. Ce peptide ELAIGIGILTV était capable plus efficacement par rapport au peptide natif de se lier à HLA-A*0201, mais aussi d'être reconnu par deux TIL de noeud de lymphes. En plus, ce peptide modifié était plus efficace en matière d'induire des CTL spécifiques de tumeurs par la stimulation de PBMC issues de patients

atteints de mélanome [Valmori et al., 1998].

Le choix de l'adjuvant est une autre piste étudiée pour améliorer l'immunogénicité de peptides. Similaire à l'adjuvant de Freund incomplet, les adjuvants Montanide ISA51 (Seppic, Paris, France) et TiterMax (CytRx Corp., Norcross, GA) ont été employés dans les études de vaccins peptidiques [Berger et al., 2002]. Leur pouvoir adjuvant est médié par l'effet de dépôt qui augmente la demi-vie du peptide au site de l'immunisation. D'autres adjuvants biologiques pro-inflammatoires tels que le BCG, des virosomes du virus de la grippe ont été aussi employés pour améliorer l'immunogénicité des peptides [Berger et al., 2002]. Plus récemment, les adjuvants comportant des molécules actives en immunologie ont attiré beaucoup d'attention. Ils comprennent des cytokines, des chimiokines, des molécules de costimulation, ainsi que d'autres immunomodulateurs qui peuvent amplifier et diriger la réponse immune. Une stratégie récente est par exemple d'employer une combinaison de GM-CSF et de molécules de costimulation (telles que le CD40L ou des anticorps agonistes anti-CD40) en combinaison avec d'autres cytokines favorables à la réponse Th1 et CTL (tels qu'IL-12 et IL-15). Le GM-CSF permet le recrutement de DCs et les molécules de costimulation peuvent induire la maturation de DCs. D'autres combinaisons ont été aussi décrites chez des modèles animaux [Berzofsky et al., 2004]. Rosenberg et al. [Rosenberg et al., 1998] ont montré que 42% des patients atteints de mélanome qui ont reçu un vaccin peptidique avec l'adjuvant de Freund incomplet (IFA) plus de l'IL2 ont eu une réponse objective clinique, tandis qu'aucun des patients qui ont reçu le vaccin peptidique avec le seul IFA n'avaient pas de réponse clinique. Une étude plus récente qui compare trois adjuvants différents, IFA, GM-CSF et QS21, injectés avec le même peptide (tyrosinase) aux patients atteints de mélanome, a montré que QS21 et GM-CSF sont supérieurs à IFA pour l'obtention d'une réponse lymphocytaire T [Parmiani et al., 2003].

La dose de peptide administrée est un autre facteur qui participe à l'immunogénicité des peptides. De multiples études ont été effectuées avec des doses croissantes de peptides afin d'évaluer l'immunogénicité du peptide à différentes doses [Moreland et al., 1996, Wang et al., 1999a, van Driel et al., 1999]. Cependant, il est difficile de tirer une conclusion générale de ces études, car la longueur et la stabilité du peptide, le choix de l'adjuvant, la dose, les voies d'administration, ainsi que les moyens d'analyse de la réponse immune changent considérablement d'une étude à l'autre. En outre, les

cohortes de patients étaient généralement trop petites pour aboutir à une conclusion sur l'efficacité de chaque dose. Toutefois, on peut noter qu'aucune toxicité liée à la dose des peptides n'a été observée, même pour des doses de $2000\mu\text{g}$ d'un peptide de MART-1 [Berger et al., 2002]. Les toxicités qui ont été observées ne sont pas liées à la dose des peptides, mais sont une conséquence de l'adjuvant utilisé. Apparemment, la dose de $100\mu\text{g}$ à $1000\mu\text{g}$ semble appropriée pour induire une réponse immunitaire [Berger et al., 2002]. En revanche on ne connaît pas les doses minimales pour produire une réaction immune efficace ce qui devrait être évalué.

En conclusion, la vaccination peptidique contre les cancers a effectué des progrès considérables et reste encore un domaine actif d'investigation. Il est toutefois clair que les résultats sont insuffisants et doivent être améliorés. Un obstacle important est la capacité des cellules tumorales d'échapper à la réponse immune. C'est pourquoi, les efforts actuels tentent d'éviter les résistances. Par exemple des vaccins composés de plusieurs épitopes (vaccins multi-épitopiques) pourraient être utilisés pour contrer l'hétérogénéité d'expression des antigènes tumoraux entre cellules ou au sein d'une même tumeur. L'expression des complexes HLA/peptides sur les cellules cibles pourraient être augmentée par l'administration de l'INF- α ou l'INF- γ . D'autres études combinant des épitopes T CD4+ et CD8+ nécessiteraient d'être menées

3.2 Vaccins à base de protéines

L'application des vaccins à base de peptides est limitée par la restriction qu'impose les molécules HLA et la nécessité de définir les épitopes. Ces limites peuvent être surmontées en employant des vaccins à base de protéines. En effet, les protéines peuvent présenter tous leurs épitopes possibles au système immunitaire et de ce fait, contourne le problème que pose la restriction des molécules HLA. De plus, les vaccins à base de protéines sont censés ne pas présenter de risque infectieux.

Il y a peu d'études effectuées au moyen de protéines. La partie la plus délicate réside dans le choix de l'adjuvant. Dans l'étude de Marchant et al., la protéine recombinante MAGE-A3 a été combinée avec l'adjuvant SBAS-2 contenant MPL et QS21 et injectée à 57 patients atteints de cancer MAGE-A3 positif. Ce vaccin était bien toléré par les patients. Finalement 2 réponses partielles, 2 réponses intermédiaires et une symptôme stable ont été observés [Marchand et al., 2003]. Plusieurs méthodes de pré-

paration ont été étudiées avec l'antigène NY-ESO 1 : utilisation du complexe immun antigène /anticorps, protéine exprimée par des cellules transfectées par un adénovirus ou plus récemment protéine associée à un adjuvant Iscomatrix [Davis et al., 2004]. Les résultats de cette dernière vaccination, réalisée sur 42 patients, sont prometteurs. Ils montrent une régression de la tumeur chez 17 des 19 patients traités par le vaccin alors que 5 patients placebo sur 7 ont rechuté. Le vaccin est bien toléré par les patients qui ont été suivis sur une moyenne de 748 jours. Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ ont été isolés après la vaccination traduisant l'efficacité du vaccin et confirmant l'intérêt de travailler avec des protéines entières.

3.3 Vaccins à base de vecteurs viraux

Une variété de vecteurs viraux initialement prévus pour la thérapie génique ont été adaptés à l'immunothérapie du cancer. Les séquences d'ADN d'antigènes tumoraux peuvent être insérées dans des poxvirus atténués qui sont incapables de se répliquer chez les mammifères (tels que vaccinia Ankara, fowlpox, ou canarypox modifié). D'autres vecteurs incluent des vecteurs viraux recombinants (adénovirus, retrovirus, lentivirus), qui sont des virus modifiés. Ils ont été mutés de manière à ne pas pouvoir produire de virions infectieux après la primo infection d'une seule cellule cible. Ils expriment toutefois de manière efficace le gène étranger inséré dans le vecteur. L'intérêt de la vectorisation d'un antigène est de le diriger dans la voie de présentation des molécules du HLA I et HLA II. Cette forme d'immunisation génétique a également eu comme conséquence des réponses immunes faibles chez l'homme, bien que les vecteurs poxviraux soient démontré une capacité claire de stimuler les cellules T [Ribas et al., 2003]. La faible immunogénicité de l'antigène tumoral peut être due à plusieurs causes : 1) la présence d'anticorps neutralisants préexistants dirigés contre le vecteur (ce qui est fréquent pour les adénovirus) ; 2) la faible capacité intrinsèque de stimuler une réponse immune contre le transgène par opposition aux antigènes viraux ; 3) la dominance d'épitopes viraux qui diminue la réponse immune de l'hôte vis à vis d'épitopes antigénique de tumeur ; 4) la réponse cytotoxique est biaisée vers une réponse humorale. L'augmentation du pouvoir immunogénique du vecteur viral peut être réalisée par coexpression des cytokines ou des molécules de costimulation dans le vecteur viral. Les vecteurs viraux possèdent en effet la capacité de porter

et d'exprimer de multiples gènes [Abrams and Schlom, 2000]. Par conséquent, l'efficacité de ces vecteurs peut être augmentée par l'addition des gènes des molécules immunostimulatrices ou des cytokines.

3.4 Vaccins à base d'ADN nu

L'injection intramusculaire de séquences nues d'ADN conduit à l'expression de gène et la génération de réponses immunes. Ces ADNs plasmidiques se composent d'un gène codant pour l'antigène et de séquences promotrices qui régulent l'expression constitutives de l'antigène. Ces plasmides peuvent être conjugués avec des particules d'or et propulsés dans la peau à l'aide d'un pistolet qui utilise de l'hélium comme agent de propulsion. L'antigène protéique produit par les cellules cibles (habituellement des myocytes ou des fibroblastes, selon l'itinéraire d'injection) est capté par les APCs de l'hôte, dégradé et présenté au système immunitaire dans les ganglions. Comme toutes les stratégies vaccinales basées sur des antigènes définis, l'utilisation d'ADN nécessite d'identifier les cibles antigéniques, de les cloner et de s'assurer de leur expression dans les tissus. Le principal handicap de cette stratégie est le faible pouvoir immunogénique des ADN nus chez l'homme alors qu'il semble très élevé chez la souris. En particulier, les réponses anti-tumorales sont faibles. Des résultats plus prometteurs ont toutefois été observés pour des antigènes d'agents infectieux comme le papillomavirus [Ribas et al., 2003].

Les moyens pour augmenter le pouvoir immunologique de l'immunisation génétique à base d'ADN incluent 1) l'augmentation de la dose de plasmide (les primates et les humains semblent avoir besoin de doses beaucoup plus élevées que de plus petits animaux pour produire des réponses immunes détectables) ; 2) la coexpression de molécules immunostimulatrices telles que des cytokines, chemokines, ou molécules de costimulation ; et 3) l'insertion d'un alpha replicon de virus ou de protéines intracellulaires de transport du virus de l'herpès.

3.5 Vaccins à base de cellules

3.5.1 Vaccins utilisant des cellules tumorales entières

Par référence aux vaccins contenant des pathogènes atténués et en raison de l'absence d'antigènes tumoraux définis, les premiers vaccins anticancéreux étaient composés de cellules tumorales entières préalablement irradiées. Des cellules tumorales autologues sont obtenues à partir des tumeurs excisées par le chirurgien puis utilisées comme vaccin. Chaque patient est vacciné avec ses propres cellules tumorales. Ces cellules tumorales sont irradiées ou atténuées pour empêcher leur prolifération *in vivo* et réinjectées chez des patients avec ou sans immunomodulateurs tels que BCG ou *C. parvum* [Kim et al., 2002]. Cette stratégie présente l'intérêt d'immuniser contre tous les antigènes associés à la tumeur. Cependant, ces vaccins composés de cellules autologues nécessitent qu'un spécimen tumoral soit obtenu pour chaque patient. Pour éviter ce problème, des vaccins allogéniques de cellules tumorales ont été formulés en lysats et obtenus à partir de lignées cellulaires stables dérivées de tumeurs d'autres patients. L'efficacité des vaccins allogéniques repose sur l'existence d'antigènes partagés entre les différentes tumeurs et qui sont indépendants du donneur. Les vaccins allogéniques ont l'avantage d'être plus aisément applicables à un plus grand nombre de patients indépendamment de la disponibilité de la tumeur [Ribas et al., 2003].

Toutefois, un inconvénient important des vaccins à base de cellules tumorales entières est que ces préparations ne sont que faiblement immunogènes. En effet, la majorité des essais cliniques portant sur ces vaccins n'ont pas pu clairement démontrer d'activité anti-tumorale [Ribas et al., 2003].

3.5.2 Les vaccins utilisant des cellules tumorales génétiquement modifiées

Les vaccins utilisant des cellules tumorales génétiquement modifiées se composent de cellules tumorales autologues transfectées de manière stable par un gène immunostimulateur. L'hypothèse originale était que l'expression de cytokines tels que l'IL2 ou l'IFN- γ , ou la molécule de costimulation B7.1, permettrait à la cellule tumorale de fournir tous les signaux pour l'activation de cellules T cytotoxiques par une voie d'activation directe. Ceci éviterait l'étape de présentation assurée par les APCs de

l'hôte et l'aide de lymphocyte T CD4+. Cependant, la comparaison de la capacité antitumorale de ces vaccins dans les modèles préclinique a montré que l'introduction de GM-CSF dans des cellules tumorales produit le vaccin le plus actif [Ribas et al., 2003]. Des chimères de moelle ont été employées et ont permis de démontrer que les vaccins transfectés par GM-CSF attirent les APCs, qui captent les antigènes tumoraux et les présentent au système immunitaire de l'hôte. Ce vaccin comportant du GM-CSF semble donc amplifier la voie de présentation des antigènes par les DCs et stimuler le système immunitaire par une voie directe, c'est-à-dire qui utilise la cellule tumorale génétiquement modifiée comme une APC [Ribas et al., 2003].

Plusieurs vaccins de ce type ont fait l'objet d'essais cliniques pendant plusieurs années. Leur fabrication exige des cultures de cellules tumorales de chaque patient, suivi de la sélection des cellules qui expriment le transgène de manière adéquate. Ce travail peut prendre des mois. Pour éviter ce long processus de fabrication, d'autres voies ont été explorées, y compris l'utilisation de vaccins de cellules tumorale allogéniques génétiquement modifiées, l'utilisation de vecteurs viraux ayant une bonne capacité de transduction etc. Ces stratégies diminuent le temps de production de vaccins. Cependant, les vaccins à base de cellules tumorales entières génétiquement modifiées présentent des risques pour la santé des patients. Le plus sérieux est le risque d'induire une maladie autoimmune. Ceci a d'ailleurs été observé dans des modèles animaux, ainsi que lors d'essais cliniques [Ribas et al., 2003].

3.5.3 Vaccins à base des DCs

Les DCs sont les APCs professionnelles les plus efficaces pour induire l'activation des lymphocytes T CD8+ et CD4+ in vivo. La capacité des DCs d'induire des réponses immunes antitumorales in vivo a été documentée dans beaucoup de modèles animaux. Ces expériences ont été réalisées par obtention in vitro de DCs, par le chargement des DCs avec l'antigène tumoral et par l'injection de DCs chargées avec l'antigène dans les animaux. Les DCs chargées avec des lysats de tumeur, avec des peptides dérivés d'antigènes tumoraux ou avec des protéines entières sont capables de produire des réponses immunes spécifiques des tumeurs et possèdent une activité antitumorale (voir les revues dans [Fong and Engleman, 2000]). Plus précisément, les DCs chargées d'antigènes peuvent induire une régression de tumeur préexistante. Ces

observations faites chez l'animal ont favorisé les essais chez l'homme.

3.5.3.1 Approches utilisées pour le chargement des antigènes

Différentes méthodes de chargement des antigènes ont été employées pour la présentation d'antigènes par les DCs. Pour les antigènes bien caractérisés, les épitopes peptidiques synthétisés, ou la séquence complète d'ADN dans un vecteur viral peuvent être utilisés pour charger les DCs [Ribas et al., 2002]. Un exemple particulier est le chargement des DC par les anticorps produits par les lymphomes dont les paratopes peuvent constituer des épitopes T CD4+ ou CD8+. Les DCs chargées par ces différents moyens sont conceptuellement semblables à la vaccination de peptides ou de virus dans des adjuvants appropriés. Les DCs constituent en effet l'adjuvant. En outre, les DCs peuvent être chargées avec des antigènes définis en tirant profit des récepteurs de surface qui facilitent l'endocytose des antigènes, tels que des récepteurs de Fc qui permettent d'endocyter des complexes immuns [Rafiq et al., 2002].

Plusieurs méthodes de chargement des DCs avec des antigènes tumoraux non caractérisés ont été également examinées. Des lysats de tumeur ou des corps apoptotiques peuvent être donnés aux DCs qui peuvent internaliser ces particules par macropinocytose. Les ARNm peuvent être isolés des cellules tumorales et être transfectés dans les DCs. Les DCs produisent les différents antigènes dont certains sont spécifiques des tumeurs et présentent leurs épitopes T aux lymphocytes [Boczkowski et al., 1996].

3.5.3.2 Essais clinique de vaccins utilisant des DCs

Une liste d'essais cliniques et de leurs résultats sont présentés dans Tab. 3.3. Des patients atteints de mélanome ont été les premiers à être vaccinés avec des DCs autologues chargées de peptides d'antigènes du mélanome. Les vaccinations basées sur les DCs ont été généralement bien tolérées et les symptômes locaux et systémiques étaient semblables à ceux résultant de vaccinations basées sur les peptides. Dans la première étude publiée, les patients atteints de mélanome et ayant des métastases ont reçu des DCs chargées *in vitro* avec des peptides de MelanA/MART-1, de tyrosinase, de gp100 de MAGE-A1 ou avec des lysats de tumeur. Les DCs ont été injectées au niveau des ganglions [Schadendorf and Nestle, 2001]. Le taux de réponse était de 25% avec trois

réponses complètes (CRs) durables (Tab. 3.3), alors qu'on observait une réaction immunitaire spécifique mesurée par DTH dans 30% de cas. Dans d'autres essais, aucune réponse clinique majeure n'a été observée en dépit de l'induction fréquente de CTLs, comme dans l'étude avec le peptide MAGE-A3 [Turner et al., 1999]. Une étude plus récente a mis en évidence une réponse CTLs avec au moins un des quatre peptides de mélanome employés pour charger les DCs, chez 16 sur 18 patients vaccinés, un résultat qui a été accompagné de trois CRs et de 13 réponses intermédiaires [Banchereau and Palucka, 2001]. Ceci suggère que les vaccins polyépitopiques sont supérieurs aux vaccins qui incluent seulement un peptide, au moins dans l'induction d'une réponse de CTLs.

Les vaccins à base de DCs ont été aussi testés dans d'autres cancers que le mélanome. Tab. 3.3 montre les résultats des études avec des patients atteints du cancer de la prostate qui ont reçu des peptides issus des antigènes spécifiques de la prostate (PSA, PSMA et PAP). Aucune réponse claire en lymphocytes T n'a été détectée et les résultats cliniques ont été essentiellement transitoires : 50% de réduction du niveau sérique de PSA pour 30% de sujets [Murphy et al., 1999]. Dans une étude récente utilisant des DCs autologues transfectées avec l'ARNm de PSA, trois CRs ont été rapportées. La réponse des cellules T anti-PSA était détectable chez les 11 sujets examinés parmi les 13 vaccinés [Heiser et al., 2002]. On peut également noter l'étude réalisée au moyen d'un peptide agoniste de CEA, CAP1, sur des patients atteints de cancer de colon dont les DCs étaient également mobilisées *in vivo* par l'injection de Flt3. Cette étude a obtenu deux CRs et deux SDs (stable disease) [Fong et al., 2001b].

En conclusion, les DCs semblent être un moyen efficace pour augmenter les réponses immunes spécifiques des antigènes tumoraux. Toutefois leur utilisation nécessite de cultiver des DCs autologues pour produire des vaccins personnalisés. Il est donc nécessaire d'avoir un équipement très spécifique et un personnel avec un niveau élevé d'expérience, le coût est donc élevé. De plus, il est difficile d'obtenir des méthodes très normalisées d'obtention des DCs, d'évaluation du statut de maturation et d'efficacité du chargement en antigène. Ceci rend difficiles les comparaisons entre les différents essais. Finalement, les protocoles utilisés pour cultiver les DC génèrent différentes sous-populations de cellules qui donnent naissance à des lymphocytes T effecteurs différents. Un progrès à réaliser sera peut-être de mieux contrôler les conditions de

| Tumour | Vaccine | No. of patients | Clinical response | % | Réf. |
|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------------|----|--------------------------------|
| Melanoma | MART-1+gp100+tyrosinase+MAGE-3.A2/A1 | 32 | 3 CR, 5 PR | 25 | [Schadendorf and Nestle, 2001] |
| | MAGE-3.A1 | 8 | 0 | 0 | [Thurner et al., 1999] |
| | MART-1+tyrosinase+gp100 | 28 | 2 CR, 1 PR | 17 | [Lotze et al., 2000] |
| | MART-1+tyrosine+gp100+MAGE-3 | 18 | 3 CR | 17 | [Banchereau and Palucka, 2001] |
| | MAGE-1 or -3, MART-1+gp100+tyrosinase | 14 | 1 MR, 6 SD | 0 | [Mackensen et al., 2000] |
| | Lysate | 11 | 1 PR, 3 SD | 10 | [Chang et al., 2002] |
| Prostate cancer | Temozolomide | 45 | 2 PR, 5 SD | 16 | [Schadendorf et al., 2006] |
| | PAP/GM-CSF | 31 | 0 ^a | 0 | [Small et al., 2000] |
| | PSMA/A2 | 33 | 2 CR, 6 PR | 22 | [Murphy et al., 1999] |
| | PSA/RNA | 13 | 3 CR ^a | 23 | [Heiser et al., 2002] |
| Colon cancer | Mouse PAP | 21 | 6 SD | 0 | [Fong et al., 2001a] |
| | Modified CEA/A2+KLH+Fer3L | 12 | 2 CR, 2 SD | 17 | [Fong et al., 2001b] |
| Paediatric tumours (NB, PTEN) | Lysate+KLH | 10 | 4 CR, 1 PR | 10 | - ^b |

CEA, carcino-embryonic antigen ; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; KLH, key limpet hemocyanin ;

PAP, prostate acid phosphatase ; PSA, prostate specific antigens ; PSMA, prostate-specific membrane antigens.

^a Complete clearance of circulating tumour cells.

^b Personal communication by Dr James Mulé (University of Michigan Medical Centre, Ann Arbor, Michigan).

TAB. 3.3: Résultats de vaccinations à base de DCs dans les patients avec maladies métastatiques

culture afin d'obtenir des populations de cellules dendritique plus hétérogènes.

3.6 Vaccins basés sur d'autres stratégies

3.6.1 Vaccins utilisant des protéines HSP

Les protéines HSP sont des molécules intracellulaires qui agissent comme des chaperonnes des peptides dérivés des antigènes. Quand une cellule est soumise aux changements de température, les protéines HSP se lient aux peptides intracellulaires. Ces complexes peuvent être isolés, ce qui fournit une méthode efficace d'obtention des antigènes tumoraux purifiés, non-définis. Les complexes HSP-peptide peuvent être administrés comme vaccins aux humains, et ces complexes devront être présentés de façon croisée par les APCs de l'hôte pour produire une réponse immune cellulaire. Les DCs ont des récepteurs spécifiques pour les protéines HSP (CD91, Lox-1) et leur engagement mène à la maturation des DCs [Binder et al., 2000, Delneste et al., 2002]. Par conséquent, les complexes de protéine HSP libérés par les cellules nécrotiques fonctionnent en tant que signaux de danger endogènes, et permettent la présentation croisée des antigènes tumoraux par les cellules dendritiques.

Les protéines HSP explorées pour l'immunothérapie anti cancéreuse peuvent contenir un antigène défini (l'antigène E7 dérivé du virus papillome humain, antigène MAGE) qui sont introduit par fusion de leurs séquences ADN avec le gène de HSP ou par chargement direct de l'HSP vide. Il est également possible d'utiliser l'HSP pour présenter des antigènes non définis. Les HSP sont alors purifiées à partir des échantillons de tumeurs des individus [Hoos and Levey, 2003]. Les résultats de vaccination sont encourageants sur les animaux. Les vaccins sur les humains sont testés en phase clinique III. Pour l'instant, les données de la phase I sur les leucémies myéloïdes chroniques et de la phase II sur les lymphomes non hodgkinien indiquent que les vaccins sont bien tolérés et qu'ils sont réalisables.

3.6.2 La stratégie *prime-boost*

L'administration séquentielle de l'ADN nu et d'un vecteur viral recombinant constitue une stratégie hybride, appelée prime-boost, qui sous entend une synergie entre les deux modes de vaccination [Ramshaw and Ramsay, 2000]. L'injection initiale d'un

plasmide permet l'activation sélective des cellules T mais n'entraîne qu'une expansion limitée des cellules T en raison du relativement faible potentiel inflammatoire de l'ADN nu. Après une période de repos, ces lymphocytes spécifiques de haute avidité sont amplifiés par la réexposition au même antigène dans un milieu plus inflammatoire produit par les protéines virales fortement immunogènes du vecteur viral recombinant. Les modèles précliniques murins et primates ont prouvé que la stratégie prime-boost induit des fréquences 10 à 100 fois plus élevées des cellules T que l'ADN nu ou le vecteur viral recombinant seul [Ramshaw and Ramsay, 2000]. Une modification de cette stratégie est l'administration séquentielle de deux vecteurs viraux différents portant le même gène d'antigène tumoral, qui évite le développement des anticorps neutralisants du vecteur viral. Ces stratégies sont en cours d'essais cliniques [Ribas et al., 2003].

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 4

Identification d'épitopes T CD4+ dans Trag-3

Trag-3 est un gène dont l'expression est associée à la résistance des cellules cultivées en présence de taxol. Il a été récemment identifié par Duan et al. par comparaison des ARNm entre SKOV3 (une lignée cellulaire ovarienne) et SKOV3 TR (taxol résistant). Il ne comporte pas d'homologie de séquence avec un gène connu. La caractérisation de l'expression des ARNm dans les divers tissus montre une répartition de l'expression restreinte uniquement aux cellules germinales [Duan et al., 1999]. En revanche, la protéine est exprimée dans des tumeurs d'origines tissulaires diverses et fait donc partie des antigènes spécifiques des tumeurs ou "cancer testis". La régulation de la transcription du gène est régulée par la déméthylation du promoteur associé [Yao et al., 2004].

Le taxol est une molécule utilisée lors de la chimiothérapie antitumorale. C'est une molécule naturelle extraite de l'écorce et des aiguilles de l'if (*Taxus brevifolia*). Cet antiméiotique agit en inhibant la dépolymérisation de la tubuline, empêchant ainsi la division cellulaire. Bien que son utilisation se révèle efficace dans le traitement des cancers, il s'est avéré que des patients pouvaient développer une résistance au taxol. Si Trag-3 ne participe pas directement au phénotype de résistance au taxol, il a été supposé que sa surexpression pouvait être liée soit à des gènes voisins directement impliqués dans la résistance aux drogues, soit à une co-régulation avec d'autres antigènes Cancer/Testis. La séquence codante Trag-3 est localisée au sein du complexe des gènes Mage au niveau du locus Xq28.

Trag-3 est spécifiquement surexprimé dans une variété de tumeurs comprenant 78% de mélanomes, 60% de cancers du sein, et 54% de carcinomes de poumon non à petites cellules (NSCLC) [Janjic et al., 2006]. Son expression dans de nombreux types tumoraux, son absence d'expression dans les cellules normales et son association avec la résistance au taxol en font une cible attrayante pour l'immunothérapie anticancéreuse. En effet un vaccin qui induirait une réponse immunitaire dirigée contre les cellules exprimant l'antigène Trag devrait permettre de lutter contre les résistances au taxol. La vaccination pourrait être effectuée en association avec la délivrance de taxol. De multiples peptides restreints à la molécule HLA-A*0201 et capables d'induire des CTLs ont été rapportés [Zhu et al., 2003]. Cependant, il n'y a que le peptide 58-66 qui donne naissance à des CTLs capables de lyser une lignée cellulaire de mélanome qui exprime le Trag-3 et HLA-A*0201. Ces premiers résultats démontrent l'immunogénicité de l'antigène. Toutes les régions épitopiques de la protéine reconnues, soit par les lymphocytes T CD4+, soit par des lymphocytes T CD8+ restent à identifier. En particulier, à ce jour, aucun épitope T CD4+ de Trag3 n'a été rapporté. Un vaccin basé sur la préparation de cellules dendritiques chargées par le peptide Trag-3 (58-66) est en cours d'évaluation par l'équipe de Zhu [Zhu et al., 2003].

4.1 Objectif de travail

Les cellules T CD4+ jouent un rôle crucial dans l'initiation et l'entretien de cellules T CD8+ effectrices et l'activation de cellules B pour la production d'anticorps. L'identification des épitopes T CD4+ est donc importante non seulement pour l'étude des réponses immunes spontanées spécifiques d'antigènes des patients atteints de cancer mais également pour le développement des vaccins anti-cancer. La diversité et le polymorphisme des molécules HLA II constituent les limites les plus importantes à la caractérisation et à l'utilisation des épitopes T. En Europe et aux USA, 10 molécules sont prépondérantes et couvrent l'essentiel de la population. Il s'agit de 7 allèles du locus HLA-DRB1 : 0101, 1501, 0301, 0401, 1101, 1301, 0701 et des allèles DRB3*0101, DRB4*0101 et DRB5*0101. De plus, il semble que certaines molécules partagent des modes de liaison de peptides. Ainsi, des peptides sont connus pour se lier à plusieurs molécules, au point d'être considérés comme universels. Bien évidemment ce sont ces peptides qui sont les meilleurs candidats pour l'immunothérapie et qui sont le plus

souvent recherchés.

Cette partie de ma thèse est une collaboration entre notre laboratoire et celui du Dr. Hassan Zarour de l'université de Pittsburgh. Notre objectif était d'identifier les peptides dérivés de Trag-3 capables d'être présentés par plusieurs molécules HLA II et d'évaluer leurs propriétés immunonologiques. J'ai réalisé la première partie de ce travail. J'ai synthétisé les peptides et évalué leur capacité de liaison aux molécules HLA II. La deuxième partie de travail a été effectuée à Pittsburgh. Le Dr Hassan Zarour a évalué l'immunogénicité in vitro des peptides que j'avais étudiés et évalué la réponse spontanée contre ces peptides chez des patients atteints de différents cancers.

4.2 Présentation de l'article

Synthèse de peptides et tests de liaison 15 peptides chevauchants de 15 acides aminés couvrant toute la séquence de Trag-3 ont été sélectionnés. Le découpage de la séquence de Trag-3 en peptides n'a pas été effectuée au hasard. Nous n'avons en effet retenu que les peptides pouvant accueillir un résidu aliphatique ou aromatique dans la poche P1 des molécules HLA II. Ils ont été synthétisés selon la stratégie Fmoc sur un synthétiseur multiple. La qualité de chaque peptide a été contrôlée par spectrométrie de masse.

Le principe du test de liaison est celui d'un test ELISA en compétition. Les molécules HLA-II (10 molécules de HLA-DR et 2 molécules de HLA-DP4) sont purifiées à partir de cellules EBV selon le protocole que nous avons décrit en détail précédemment [Castelli et al., 2002]. Chaque purification nécessite plus de 5×10^9 cellules soit plus de 5 litres de culture. Les molécules sont extraites des culots cellulaires au moyen de détergents puis sont purifiées par immunoaffinité. Les anticorps monoclonaux utilisés sur ces colonnes sont produits en grande quantité au laboratoire. Ces tests de liaison se font en compétition avec un peptide biotinylé. Des dilutions (6 à 12 points) de chaque peptide à tester sont incubées en présence du peptide biotinylé et de molécule HLA-DP4. Après 24 à 48 heures, les complexes HLA II/peptide biotinylé sont incubés sur des plaques ELISA, sur lesquelles un anticorps monoclonal spécifique des molécules HLA II a été adsorbé. La présence des complexes est révélée au moyen du système avidine-biotine. Les propriétés de liaison du peptide testé sont décrites par son IC_{50} , concentration à laquelle il inhibe 50% de la liaison du peptide biotinylé.

Nous avons testé ces 15 peptides avec 10 molécules de HLA-DR et 2 molécules de HLA-DP4 incluant les 7 molécules codées par le gène HLA-DRB1 genes (à savoir : HLA-DRB1*0101, HLADRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLADRB1*0701, HLA-DRB1*1101, HLADRB1*1301, et HLA-DRB1*1501), 3 molécules codées par les gènes HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5, et les molécules HLA-DPB1*0401 et 0402 (Tab I de l'article). Le critère pour distinguer les peptides actifs des peptides négatifs est de $IC_{50} < 1000nM$.

Nous avons trouvé principalement trois régions distinctes de la protéine Trag-3 capables de se lier au moins à une molécule. Dans la région N-terminale, le peptide 1-15 peut seulement se lier au HLA-DRB1*0101. Dans la région 38-66, chacun de ces quatre peptides chevauchants peut se lier à deux molécules différentes (HLA-DRB1*0101, DRB1*1101, DRB5*0101, DPB1*0401, and DPB1*0402). Seulement la région 28-48 comprend des peptides qui montrent une activité avec plusieurs molécules. Plus précisément, le peptide 34-48 est capable de se lier efficacement aux 6 allèles de HLA-DR (HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1501, and HLA-DRB5*0101 (HLA-DR51)).

L'étude de l'immunogénicité sur des patients et des donneurs sains Les 15 peptides ont été testés pour leur capacité à induire des cellules T CD4+ spécifiques de 2 patients atteints de mélanome et de 2 donneurs sains. La technique est décrite en détail dans la partie "matériel et méthodes" de l'article. Les résultats montrent que seulement le peptide 34-48 est capable d'induire une réponse T CD4+ non seulement chez les deux donneurs sains, mais aussi chez les deux patients atteints de mélanome (Fig. 1 de l'article). Les cellules T CD4+ induites chez les donneurs sains ou les patients par le peptide 34-48 ont été isolées pour être caractérisés. Les résultats montrent que les cellules T CD4+ spécifiques du peptide 34-48 peuvent reconnaître le peptide 34-48 dans le contexte HLA-DRB1*0101, DRB1*0401, et DRB1*0701, et que ces cellules T CD4+ peuvent aussi reconnaître l'antigène natif présenté par les DCs autologues (Fig.2 de l'article). Plusieurs clones en provenance d'un patient et d'un donneur sain ont été obtenus par dilution limite des cellules T CD4+ spécifiques du peptide 34-48. Ces clones sont capables de reconnaître l'antigène natif présenté par les DCs autologues (Fig. 3 de l'article).

Détection de la réponse spontanée chez les patients atteints de cancer La question posée était de savoir si l'antigène Trag-3 donne naissance à des réponses spontanées chez les patients atteints de différents cancers. Des prélèvements sanguins ont été récoltés auprès de 12 patients atteints de mélanome, 13 patients atteints de cancer du sein, 14 patients atteints de cancer du poumon, et 9 donneurs sains. Dans chacun de ces échantillons la présence de cellules T CD4+ capables de reconnaître le peptide 34-48 (Tab. II de l'article) a été recherchée. Les cellules T ont été restimulées une fois par ce peptide avant d'être testées par Elispots IFN- γ , IL-5, et IL-10. Les résultats (Fig. 4 de l'article) montrent que la présence de cellules T CD4+ spécifiques de Trag-3 a été observée chez 9 patients parmi les 12 patients atteints de mélanome étudiés. Ces 9 patients examinés par RT-PCR expriment tous Trag-3. Les cellules T CD4+ spécifiques de Trag-3 sont de type Th1 pour 6 patients parmi les 9, Th0 pour les 3 restants. 4 patients atteints de cancer du sein ont aussi développé des réponses T CD4+ spécifiques de Trag-3 de type Th1. Aucun patient de cancer du poumon et aucun donneur sain n'a développé de cellules T CD4+ spécifiques de Trag-3. Le profil de la production d'anticorps a été également étudié (Fig. 4 de l'article). Aucun patient ne présente de réponse humorale dirigée contre Trag-3 même si on considère ceux qui ont développé une réponse en lymphocytes T CD4+ spécifiques de Trag-3. En revanche, parmi ces mêmes patients, on observe fréquemment des réponses en lymphocytes T CD4+ spécifiques de NY-ESO 1 qui coexistent avec la présence d'anticorps anti-NY ESO 1 circulants.

De plus, cette étude montre que les traitements à base de taxol n'a pas induit des réponses spontanées spécifiques de Trag-3 *in vivo*, et que les 9 patients atteints de mélanome qui ont eu des réponses spontanées spécifiques de Trag-3 n'ont pas précédemment subi de traitements à base de taxol.

Etude de la diversité de répertoire T CD4+ spécifiques de Trag-3 La diversité de répertoire T CD4+ spécifiques de Trag-3 a été étudiée par le Dr. Hassan Zarour. 10 clones de cellules T CD4+ spécifiques de Trag-3 ont été isolés respectivement d'un patient et d'un donneur sain. La région du gène TCR β CDR3 a été séquencée pour ces 20 clones (Tab. III de l'article). Les 10 clones isolés du patient montrent une région unique de TCR β CDR3. En revanche, ceux isolés du donneur sain montrent 3 régions distinctes de TCR β CDR3.

Spontaneous CD4⁺ T Cell Responses against TRAG-3 in Patients with Melanoma and Breast Cancers¹

Bratislav Janjic,* Pedro Andrade,* Xiao-Fei Wang,[§] Julien Fourcade,* Christine Almunia,[§] Pavol Kudela,*[‡] Adam Brufsky,* Samuel Jacobs,* David Friedland,* Ronald Stoller,* Daniel Gillet,[§] Ronald B. Herberman,* John M. Kirkwood,* Bernard Maillere,[§] and Hassane M. Zarour^{2*†}

The taxol resistance gene *TRAG-3* was initially isolated from cancer cell lines that became resistant to taxol in vitro. *TRAG-3* is a cancer germline Ag expressed by tumors of different histological types including the majority of melanoma, breast, and lung cancers. In the present study, we report that patients with stage IV melanoma and breast cancers developed spontaneous IFN- γ -producing CD4⁺ T cell responses against a single immunodominant and promiscuous peptide epitope from *TRAG-3* presented in the context of multiple HLA-DR molecules. The *TRAG-3*-specific CD4⁺ T cells and clones were expanded in vitro and recognized not only peptide pulsed APCs but also autologous dendritic cells (DCs) loaded with the *TRAG-3* protein. All stage IV melanoma patients with *TRAG-3*-expressing tumors developed spontaneous CD4⁺ T cell responses against *TRAG-3*, demonstrating its strong immunogenicity. None of these patients had detectable IgG Ab responses against *TRAG-3*. *TCR β* gene usage studies of *TRAG-3*-specific CD4⁺ T cell clones from a melanoma patient and a normal donor suggested a restricted TCR repertoire in patients with *TRAG-3*-expressing tumors. Altogether, our data define a novel profile of spontaneous immune responses to cancer germline Ag-expressing tumors, showing that spontaneous *TRAG-3*-specific CD4⁺ T cells are directed against a single immunodominant epitope and exist independently of Ab responses. Because of its immunodominance, peptide *TRAG-3*_{34–48} is of particular interest for the monitoring of spontaneous immune responses in patients with *TRAG-3*-expressing tumors and for the development of cancer vaccines. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 2717–2727.

The CD4⁺ Th cells play a crucial role in B cell activation for Ab production and in the generation and the maintenance of Ag-specific effector CD8⁺ T cells (1–4). Therefore, the identification of Th epitopes is of first importance not only for the study of spontaneous Ag-specific immune responses in patients with cancer but also for the development of cancer vaccines with Th epitopes that may optimally stimulate antitumor CD8⁺ memory T cells. We and others (5–15) have developed strategies to identify novel MHC class II epitopes capable of stimulating Th1-type tumor Ag-specific CD4⁺ T cells. These efforts have led to the identification of a number of epitopes that are currently used in phase I/II trials peptide-based vaccines.

We have focused our research efforts on the discovery of epitopes from cancer germline Ags (CGAs),³ expressed by tumors

of different histological types but not by normal tissues, except testis. Because the germ cells in testis do not express MHC class I and class II molecules (16), the CGA-derived epitopes are specifically expressed by tumor cells. CGAs appear to give rise to multiple MHC class II-restricted epitopes recognized by CD4⁺ T cells (8–10, 12, 17, 18). In patients with active cancers, CGAs may spontaneously stimulate Abs and circulating CD4⁺ T cells that are most often detectable only after one round of in vitro stimulation with peptide-pulsed APCs (18, 19). Whenever detectable, these CGA-specific CD4⁺ T cells appeared to be associated with the presence of circulating Ag-specific Abs (18). However, few correlative analyses of Ab and T cell responses have been performed, and more studies are needed to better understand the immunological basis of spontaneous immune responses to tumor Ags in cancer patients and to further optimize cancer vaccines strategies.

Here, we have investigated the spontaneous CD4⁺ T cell and Ab responses in patients with active solid tumors that commonly expressed the taxol resistance-associated gene-3 (*TRAG-3*), including melanoma, breast, and lung cancers. *TRAG-3* is expressed by a wide range of solid tumors including 78% of melanoma cell lines and all tested melanoma tumor samples (20), 60% of breast cancers (21), and 54% of non-small cell lung carcinoma (NSCLC) (22). The *TRAG-3* gene was originally isolated from tumor cell lines that became resistant to taxol in vitro (23) and is induced by demethylation of tumor cell lines (24). Multiple HLA-A2-presented peptides capable of stimulating CD8⁺ T cells from PBL of normal donors or patients with tumors have been reported (25, 26). However, only the epitope *TRAG-3*_{56–68} successfully stimulated CTLs that recognized and lysed *TRAG-3*-expressing tumor cells. To date, no MHC class II epitope from *TRAG-3* has yet been reported.

*Department of Medicine and Division of Hematology/Oncology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213; [†]Department of Immunology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213; [‡]Cancer Research Institute, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia; [§]Protein Engineering and Research Department, CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

Received for publication March 29, 2006. Accepted for publication June 2, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by National Institutes of Health/National Cancer Institute Grants CA90360 and CA112198 (to H.M.Z.), a Clinical Trial Grant/Melanoma Initiative from the Cancer Research Institute (to H.M.Z.), and a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (to B.M.).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Hassane M. Zarour, Hillman Cancer Center, Research Pavilion, University of Pittsburgh Cancer Institute, Suite 1.32, 5117 Centre Avenue, Pittsburgh, PA 15213. E-mail address: zarourhm@upmc.edu

³ Abbreviations used in this paper: CGA, cancer germline Ag; *TRAG*, taxol resistance gene; UPCI, University of Pittsburgh Cancer Institute; DC, dendritic cells; NSCLC, non-small cell lung carcinoma; IC₅₀, concentration of peptide that prevented binding of 50% of the labeled peptide.

In this study, we observed that patients with stage IV melanoma and breast cancer developed IFN- γ -producing CD4⁺ T cell responses against a single immunodominant and promiscuous epitope from TRAG-3. All patients with stage IV melanoma and TRAG-3-expressing tumors had detectable TRAG-3-specific CD4⁺ T cells, but no circulating TRAG-3-specific Ab. Our findings add to the diversity of the spontaneous immune responses to CGA-expressing tumors observed in patients with advanced cancers. They also provide a good candidate for the monitoring of spontaneous immune responses in patients with TRAG-3-expressing tumors and for the development of TRAG-3-based cancer vaccines.

Materials and Methods

Cell lines, media, and Abs

Tissues and blood samples utilized for all studies reported in this article were obtained under the University of Pittsburgh Cancer Institute (UPCI) Institutional Review Board-approved protocols 96-099 and 99-088. HLA-DR and HLA-DP genotyping of melanoma patients and normal donors was performed using commercial typing panels of PCR primers according to the manufacturer's instructions (Dylan). HLA-DRB1*0401-transfected T2 cells, i.e., T2.DR4 cells, and HLA-DR-transfected mouse cells, i.e., L.DR cells, were previously described (8, 27). All cell lines were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% FCS, L-arginine (116 mg/L), L-asparagine (36 mg/L), and L-glutamine (216 mg/L). The HB55 and HB95 hybridomas, secreting the L243 anti-HLA-DR (class II) mAb and the W6/32 anti-HLA-A, B, C (class I) mAb, respectively, were purchased from American Type Culture Collection. The B7/21 anti-HLA-DP (class II) mAb used in our blocking experiments was previously described (28).

Peptide synthesis

The TRAG-3-derived peptides were synthesized and stored as previously reported (8, 9). Synthesis of TRAG-3 peptides was based on the protein sequence encoded by the TRAG-3 cDNA obtained from three melanoma cell lines as detailed below.

Recombinant proteins

The TRAG-3 recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* strain B121 (DE3) from a TRAG-3 cDNA cloned in vector pTriEx (Novagen) as described under TRAG-3 cDNA sequencing. The protein was extracted from inclusion bodies in the presence of 8 M urea and purified by ion metal affinity chromatography using the 6-his tag at the N terminus of the protein. After elution, the protein sample was dialyzed against a buffer containing 2 M urea, 50 mM NaCl, and 20 mM Tris-HCl, pH 8. The TRAG-3 protein was concentrated up to 5 mg/ml. The full length NY-ESO-1 recombinant protein was produced in *E. coli* and was kindly provided by Drs. Lloyd J. Old and Gerd Ritter (Ludwig Institute for Cancer Research, New York Branch, New York, NY).

TRAG-3 cDNA sequencing

Total RNA was extracted from the three melanoma tumor cell lines UPCI-Mel 285, UPCI-Mel 558, and UPCI-Mel 527.1 using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and following the manufacturer's instructions. Reverse transcription was conducted as previously reported (29). The PCRs were performed in the presence of AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems), using the TRAG-3-specific forward primer, HZ30 (5'-TGTGGATGGGCCTCATCCAATTAGTT-3') and reverse primer, HZ27 (5'-AGCGGCGTCTTTTATGGAGAGC-3'). Both primers were designed according to the published TRAG-3 cDNA sequence (23). The PCR amplification was conducted in 50 μ l as follows: 5 min at 94°C for 5 min; then 32 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C); and finally 10 min at 72°C. The PCR products were run on 1.5% agarose gel, purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen), and sequenced using the ABI 3100 automated DNA sequencer.

Construction of pTriEx4-neo-TRAG-3 plasmid

TRAG-3 cDNA was amplified with RT-PCR from the melanoma cell line UPCI-MEL 285 using pfu DNA polymerase (Stratagene Cloning System), and the previously described TRAG-3-specific primers HZ30 and HZ27. The PCR amplification was conducted in 50 μ l as follows: 5 min at 94°C for 5 min; then 32 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C);

and finally 10 min at 72°C. The PCR product was phosphorylated and then run on a 1% agarose gel before purification using QIAquick (Qiagen). pTriEx4-neo eucaryotic expression vector (Novagen) was digested with *Sma*I restriction enzyme (New England Biolabs), dephosphorylated, and used for ligation with the TRAG-3 cDNA before transformation of Novabla Singles Competent Cells using a Clonables Ligation/Transformation Kit (Novagen) as recommended by the manufacturer.

HLA-DR peptide-binding assays

HLA-DR and HLA-DP were purified from homozygous EBV cell lines by affinity chromatography using the monomorphic mAb L243 and B7/21, respectively, which were coupled to protein A-Sepharose CL4B gel (Amersham Pharmacia Biotech) as previously described (30, 31). The binding to the multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules was performed as previously reported (30–32). Maximal binding was determined by incubating the biotinylated peptide with the MHC class II molecule in the absence of competitor. Binding specificity for each HLA-DR and HLA-DP4 molecule was ensured by the choice of the biotinylated peptides as described previously (31, 32). Data were expressed as the concentration of peptide that prevented binding of 50% of the labeled peptide (IC_{50}).

Induction of CD4⁺ T cells with peptides

The induction of CD4⁺ T cells in vitro with dendritic cells (DCs) and the TRAG-3-derived peptides was performed as previously reported (7, 9). The CD4⁺ T cells were restimulated on a weekly basis with irradiated autologous mature DCs pulsed with peptide. After at least three restimulations, the immunoreactivity of the CD4⁺ T cell cultures was analyzed in IFN- γ and IL-5 ELISPOT assays. The APCs used in ELISPOT assays were either autologous T blasts or L cells that have been genetically engineered to express HLA-DR1 (L.DR1), HLA-DR4 (L.DR4), HLA-DR7 (L.DR7), HLA-DR 53 (L.DR53), or HLA-DP4 (L.DP4). The CD4⁺ T cells were cloned by limiting dilution using allogeneic PBL and EBV-B cells as feeders in the presence of IL-2 and PHA and subsequently tested for specificity in IFN- γ ELISPOT and cytokine release assays. The CD4⁺ T cell clones were maintained by restimulation every 2 wk, by alternating irradiated allogeneic PBL and EBV-B cells or autologous peptide-pulsed DCs as stimulators.

In vitro sensitization with peptides

In vitro sensitization of CD4⁺ T cells purified from PBLs of patients and normal donors was performed as previously described (33). Briefly, CD4⁺ T cells were purified with immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec). Two million PBLs previously depleted of CD8⁺ and CD4⁺ T cells, were pulsed with 10 μ g/ml of peptide TRAG-3_{34–48} (4 h, 37°C), irradiated (3000 rads), washed, and used to stimulate 2×10^6 autologous CD4⁺ T cells in Iscove's medium (Mediatech) supplemented with 10% human AB serum (Sigma-Aldrich). After 8 h of incubation, 10 U/ml IL-2 and 5 ng/ml IL-7 were added to the culture wells, and this was repeated every 3–4 days thereafter. The remaining fraction of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was used to prepare T-APCs. The T-APC were harvested and used as target cells in IFN- γ and IL-5 ELISPOT assays.

IFN- γ and IL-5 ELISPOT assays

The recognition of APCs pulsed with peptides or proteins by the TRAG-3-specific CD4⁺ T cells and clones expanded in vitro was assessed by ELISPOT assays specific for human IFN- γ and IL-5 as previously reported (8, 9). The protein-loaded DCs were prepared as previously reported in the presence of the recombinant TRAG-3 or NY-ESO-1 proteins (30 μ g/ml). In the blocking experiments, 3 μ g each of purified anti-HLA mAb were added in each ELISPOT well.

The recognition of T-APCs pulsed with peptides by CD4⁺ cells isolated from cancer patients and in vitro sensitized as previously in this article was assessed by IFN- γ and IL-5 ELISPOT assays. Briefly, 10^5 presensitized CD4⁺ T effector cells and 10^5 targets (T-APCs) pulsed with peptides (10 μ g/ml) were added to each well and incubated for 48 h in AIM V medium (Invitrogen). Spot numbers and spot sizes were determined with computer-assisted video image analysis (Cellular Technologies). For statistical evaluation, a Student *t* test for unpaired samples was used. $p < 0.05$ was considered significant.

IFN- γ and IL-4 cytokine secretion assays

The recognition of autologous DCs pulsed with peptides (10 μ g/ml) or proteins (30 μ g/ml) was also assessed by MACS secretion assays for IFN- γ and IL-4 (Miltenyi Biotec), as previously described (10).

ELISA

Recombinant proteins were diluted in coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 30 mM NaHCO₃ (pH 9.6), with 0.02% NaN₃) to the concentration of 1 µg/ml and adsorbed to polypropylene flat-bottom 96-well plates (Corning-Costar) overnight at 4°C. Plates were washed with PBS and saturated overnight at 4°C by addition of 200 µl/well PBS containing 2% BSA. After the plates were washed, serum was diluted in PBS-2% BSA buffer and added to the plates (50 µl/well). After 2 h of incubation at room temperature, plates were washed, the secondary Ab (goat anti-human IgG-AP; Caltag Laboratories) was added (50 µl/well), and the plates were further incubated for 1 h at room temperature. Following additional washes, 50 µl/well substrate solution (phosphatase substrate system; Kirkegaard & Perry Laboratories) were added, and plates were incubated for 25 min at room temperature and read immediately (MRX Microplate Reader; Dynatech). Sera were tested over a range of 4-fold dilutions as previously described (34).

TCRβ gene usage

Total RNA was isolated from 1×10^6 CD4⁺ T cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and reverse transcription was conducted as previously reported. A panel of 24 specific primers complementary to TCR β-chain variable and a primer for the constant region were used to determine the diversity of the TCR β-chain variable repertoire (35). The PCR amplification was conducted in 50 µl as follows: 5 min at 94°C for 5 min, then 40 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C) and finally 10 min at 72°C. The PCR products were run on 1.5% agarose gel and purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA). The PCR product was cloned into pCR4-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced using the ABI 3100 automated DNA sequencer.

Results

Peptide TRAG-3₃₄₋₄₈ is a novel promiscuous epitope that binds to multiple HLA-DR molecules

Based on the published TRAG-3 cDNA sequence, we have designed specific oligonucleotide primers and used proof-reading polymerase to clone the TRAG-3 cDNA from three different melanoma cell lines as previously described in *Materials and Methods*. We have found that all three cDNA sequences were identical and slightly different from the previously reported TRAG-3 cDNA: G instead of A at position 251; T instead of A at position 263; A instead of T at position 264; and A instead of G at position 340 (23). These nucleotide differences result in a 3-aa difference at the protein level: R instead of H at position 33; L instead of H at position 37; and T instead of A at position 63. On the basis of the

new TRAG-3 sequence, we have chosen 15 overlapping 15-mer peptides. All the peptides include an aliphatic or aromatic residue in positions 1–5 because their presence at these positions is a requisite for the binding to HLA-DR and HLA-DP4 molecules. Indeed, aliphatic and aromatic residues are accommodated by the P1 pocket of these molecules and constitute the main anchor residue (32, 36). We have then synthesized the 15 overlapping peptides and evaluated their binding capacities to 10 different HLA-DR and 2 HLA-DP4 molecules including the 7 molecules encoded by the *HLA-DRB1* genes (i.e., *HLA-DRB1*0101*, *HLA-DRB1*0301*, *HLA-DRB1*0401*, *HLA-DRB1*0701*, *HLA-DRB1*1101*, *HLA-DRB1*1301*, and *HLA-DRB1*1501*), three molecules encoded by the *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4*, and *HLA-DRB5* genes and the *HLADPB1*0401* and *-0402* molecules. The data are presented in Table I.

As compared with the IC₅₀ values obtained with reference peptides that are defined as good binders, high and moderate binding was found for three distinct amino acid regions that exhibit significant binding to at least one HLA-DR molecule. In the N-terminal portion of TRAG-3, peptide TRAG-3₁₋₁₅ bound only to *HLA-DRB1*0101*. In the 38–66 region, each of the four overlapping peptides bound to two different MHC class II molecules, namely *HLA-DRB1*0101*, *-DRB1*1101*, *-DRB5*0101*, *-DPB1*0401*, and *-DPB1*0402*. Only one region (28–48) was composed of peptides that exhibit binding activities for a substantial number of MHC class II molecules. More precisely, peptide TRAG-3₃₄₋₄₈ was capable of binding very efficiently to multiple HLA-DR alleles, namely, *HLA-DRB1*0101*, *HLA-DRB1*0401*, *HLA-DRB1*0701*, *HLA-DRB1*1101*, *HLA-DRB1*1501*, and *HLA-DRB5*0101* (*HLA-DR51*).

We next performed a series of additional experiments to investigate the immunogenicity of these peptide sequences.

Peptide TRAG-3₃₄₋₄₈ was presented by multiple HLA-DR molecules to stimulate CD4⁺ T cells from two melanoma patients and two normal donors

In an independent series of in vitro experiments, we primed CD4⁺ T cells from 2 melanoma patients (patients 1 and 2) and 2 normal donors (normal donors 1 and 2) against each of the 15 overlapping

Table I. Binding capacities to MHC class II molecules of overlapping peptides from TRAG-3^a

| Peptides | HLA II Alleles | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | <i>HLA-DR B1*0101</i> | <i>HLA-DR B1*0301</i> | <i>HLA-DR B1*0401</i> | <i>HLA-DR B1*0701</i> | <i>HLA-DR B1*1101</i> | <i>HLA-DR B1*1301</i> | <i>HLA-DR B1*1501</i> | <i>HLA-DR B3*0101</i> | <i>HLA-DR B4*0101</i> | <i>HLA-DR B5*0101</i> | <i>HLA-DP B1*0401</i> | <i>HLA-DP B1*0402</i> |
| Frequency | 17.7 | 20.6 | 10.9 | 26 | 17.6 | 11.6 | 15.4 | 17.6 | 15.2 | 48.2 | 64 | 20.8 |
| Reference | 2 | 467 | 29 | 10 | 11 | 837 | 52 | 10 | 30 | 7 | 8 | 7 |
| P ₁₋₁₅ | 794 | — | — | — | 2939 | — | — | — | — | — | — | — |
| P ₇₋₂₁ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| P ₁₇₋₃₁ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| P ₂₂₋₃₆ | 2117 | — | — | — | — | — | — | — | — | 7000 | — | — |
| P ₂₈₋₄₂ | 36 | 540 | 511 | 1480 | 1068 | 671 | — | — | 4472 | 160 | 1249 | — |
| P ₃₄₋₄₈ | 21 | — | 209 | 319 | 805 | — | 62 | — | — | 295 | — | 1800 |
| P ₃₈₋₅₂ | 775 | — | 7483 | 6693 | 1691 | — | — | — | — | 92 | 6050 | 1876 |
| P ₄₃₋₅₇ | 7697 | — | — | — | — | — | — | — | — | 3146 | 414 | 760 |
| P ₄₈₋₆₂ | — | — | — | — | 1400 | 5848 | — | — | — | 185 | 780 | 1500 |
| P ₅₂₋₆₆ | 2191 | — | — | — | 40 | — | — | 1500 | — | — | 442 | 1949 |
| P ₅₇₋₇₁ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| P ₆₃₋₇₇ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| P ₇₆₋₉₀ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| P ₈₇₋₁₀₁ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| P ₉₆₋₁₁₀ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

^aPeptides (P) encompassing the whole sequence of the TRAG-3 Ag have been submitted to MHC class II binding assays. Data are expressed as IC₅₀ (nanomolar concentration) and are the means of three experiments. A reference peptide was used to validate each assay. This peptide is the nonbiotinylated form of the biotinylated peptide used in the assay. Active peptides have a IC₅₀ inferior to 1000 nM and are bold. — indicates no binding observed at the maximum concentration of 10,000 nM.

peptide sequences from TRAG-3 as previously reported and described in *Materials and Methods* (7, 9). Patients 1 and 2 have been genotyped as *HLA-DRB1*0101*⁺/*DRB1*0401*⁺/*DRB4*0101*⁺/*DPB1*0401*⁺, and *-DRB1*0401*⁺/*DRB1*1101*⁺/*DRB4*0101*⁺/*DPB1*0401*⁺, respectively. Normal donor 1 and normal donor 2 have been genotyped as *HLA-DRB1*0701*⁺/*DRB1*1101*⁺/*DRB4*0101*⁺/*DPB1*0401*⁺ (donor 1) and *HLA-DRB1*0401*⁺/*DRB1*1401*⁺/*DRB4*0101*⁺/*DPB1*0402*⁺ (donor 2), respectively.

Only peptide TRAG-3_{34–48} was capable of stimulating IFN- γ -producing CD4⁺ T cells derived from PBLs of the two melanoma patients and the two normal donors (Fig. 1).

Bulk CD4⁺ T cells isolated from patient 1 (UPCI-MEL 285) and stimulated with peptide TRAG-3_{34–48} produced both IFN- γ and IL-5 spots in the presence of L.DR1 cells and L.DR4 cells pulsed with peptide TRAG-3_{34–48} but not with an irrelevant peptide (NY-ESO-1_{119–143}) (Fig. 2, A and B). These CD4⁺ T cells also displayed reactivity against autologous DCs previously loaded with the TRAG-3 protein but not with an irrelevant protein (NY-ESO-1). This reactivity was partially inhibited by the addition of the anti-HLA-DR mAb (L243) but not the anti-HLA-A, B, C mAb (w6/32).

Bulk CD4⁺ T cells isolated from normal donor 1 and stimulated with peptide TRAG-3_{34–48} peptide specifically recognized L.DR7 cells but not L.DR11 cells or L.DP4 cells pulsed with peptide TRAG-3_{34–48} in IFN- γ and IL-5 ELISPOT assays (Fig. 2, C and D). The CD4⁺ T cells failed to produce significant amount of IFN- γ or IL-5 in the presence of APCs pulsed with peptide NY-ESO-1_{119–143}, used as an irrelevant peptide. These CD4⁺ T cells displayed reactivity against autologous DCs previously loaded with the TRAG-3 protein that was inhibited by addition of the anti-HLA-DR mAb (L243) but not the anti-HLA-A, B, C mAb (w6/32). These CD4⁺ T cells did not recognize autologous DCs loaded with the irrelevant protein NY-ESO-1 protein.

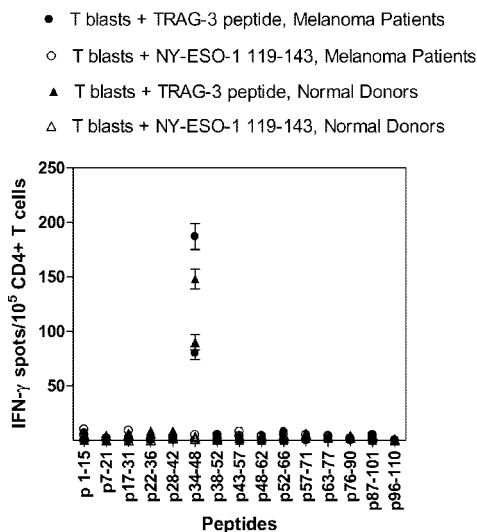


FIGURE 1. TRAG-3_{34–48} is the only TRAG-3-derived MHC class II-binding epitope capable of stimulating CD4⁺ T cells from two melanoma patients and two normal donors. CD4⁺ T cells isolated from 2 melanoma patients and 2 normal donors underwent 3 rounds of in vitro stimulation with autologous DCs pulsed with each of the 15 TRAG-3 overlapping peptides reported in Table I. Ten thousand of the responder CD4⁺ T cells were incubated in 48-h IFN- γ ELISPOT assays in the presence of T blasts pulsed with either the relevant TRAG-3 peptide (p) or peptide NY-ESO-1_{119–143} as control (10 μ g/ml). Spots were developed and counted by computer-assisted video image analysis. Each symbol represents the mean spot number of triplicates with 10⁴ CD4⁺ T cells initially seeded per well.

Bulk CD4⁺ T cells isolated from normal donor 2 and stimulated with peptide TRAG-3_{34–48} peptide produced IFN- γ and IL-5 in the presence of L.DR4 cells but not L.DP4 cells pulsed with peptide TRAG-3_{34–48} (Fig. 2, D and E). The CD4⁺ T cells failed to produce significant amount of IFN- γ or IL-5 in the presence of APCs pulsed with peptide NY-ESO-1_{119–143}, used as an irrelevant peptide. These CD4⁺ T cells displayed reactivity against autologous DCs previously loaded with the TRAG-3 protein but not with an irrelevant protein (NY-ESO-1). This reactivity was inhibited by addition of the anti-HLA-DR mAb (L243) but not the anti-HLA-A, B, C mAb (w6/32).

Altogether, our in vitro data demonstrate the ability of peptide TRAG-3_{34–48} to stimulate CD4⁺ T cells capable of recognizing peptide TRAG-3_{34–48} in the context of the HLA-DRB1*0101, -DRB1*0401, and -DRB1*0701 molecules. Importantly, these TRAG-3_{34–48} CD4⁺ T cells recognized autologous DCs loaded with the relevant protein.

*Peptide TRAG-3_{34–48} stimulated HLA-DRB1*0101 and -DRB1*0701-restricted CD4⁺ T cell clones from a melanoma patient and a normal donor that recognized autologous protein-pulsed DCs*

Several clones were obtained by limiting dilution from the CD4⁺ bulk T cells of patient 1 and normal donor 1 that recognized the TRAG-3_{34–48} peptide.

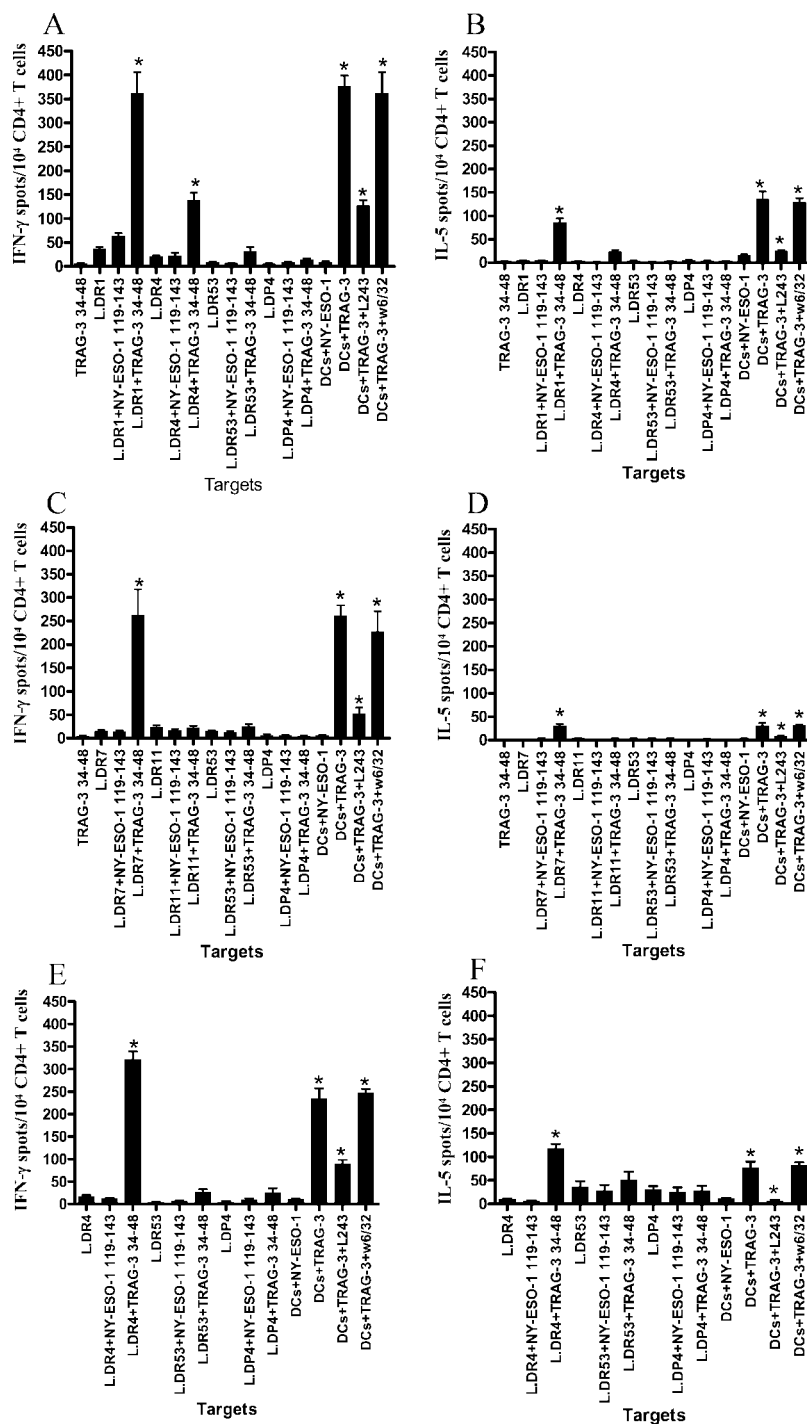
Clone 61/58 derived from PBLs of patient 1 specifically produced IFN- γ but not IL-5 in the presence of L.DR1 cells pulsed with peptide TRAG-3_{34–48} and autologous DCs loaded with the TRAG-3 protein in IFN- γ ELISPOT assays (Fig. 3A). The reactivity of this Th1-type CD4⁺ T cell clone against autologous TRAG-3-loaded DCs was partially inhibited by the addition of the anti-HLA-DR mAb (L243) but not the anti-HLA-A, B, C mAb (w6/32). No significant amount of IFN- γ production was observed in the presence of peptide TRAG-3_{34–48} alone, other L.DR cells pulsed with peptides, or autologous DCs fed with an irrelevant protein (NY-ESO-1).

CD4⁺ T cell clone 61/49 was derived from patient 1 and produced IFN- γ but not Th2-type cytokines (i.e., IL4, IL-5, and IL-10) in the presence of autologous DCs pulsed with peptide TRAG-3_{34–48} or loaded with the TRAG-3 protein but not with an irrelevant protein (NY-ESO-1) in IFN- γ -secretion assays (Fig. 3B). Autologous DCs pulsed with an irrelevant peptide (i.e., NY-ESO-1_{119–143}), and DCs loaded with the NY-ESO-1 protein served as baseline and controls.

Clone 62/4 derived from PBLs of normal donor 1 produced not only IFN- γ but also IL-5 in ELISPOT assays in the presence of L.DR7 pulsed with peptide TRAG-3_{34–48} and autologous DCs fed with the TRAG-3 protein (Fig. 3, C and D). No significant amount of IFN- γ production was observed in the presence of peptide TRAG-3_{34–48} alone, other L.DR cells pulsed with peptides, or autologous DCs fed with an irrelevant protein (NY-ESO-1). The ability of this Th0-type CD4 T cell clone to produce IFN- γ in the presence L.DR7 cells, preincubated with various concentrations of peptide TRAG-3_{34–48}, was evaluated. Half-maximal stimulation of clone 62/4 required peptide loading concentrations of ~600 nM (Fig. 3E).

We also observed that the peptide sequence TRAG-3_{34–48} 37H (with H instead of L at position 37) encoded by the previous reported TRAG-3 cDNA sequence (23) was not recognized by our CD4⁺ T cell clones (Fig. 3, A, C, and D).

FIGURE 2. Peptide TRAG-3_{34–48} stimulates CD4⁺ T cells from one melanoma patient and two normal donors that recognized peptide-pulsed APCs and autologous DCs loaded with the TRAG-3 protein. CD4⁺ T cells isolated from: and melanoma patient 1 (A and B), normal donor 1 (C and D), and normal donor 2 (E and F) underwent four rounds of in vitro stimulation with autologous DC pulsed with peptide TRAG-3_{34–48}. Ten thousand of the resulting responder CD4⁺ T cells were incubated in 48-h IFN- γ and IL-5 ELISPOT assays in the presence of L.DR1, L.DR4, L.DR7, L.DR11, L.DR53, or L.DP4 cells pulsed with either peptide TRAG-3_{34–48} or peptide NY-ESO-1_{119–143} (10 μ g/ml). The CD4⁺ T cells were also incubated in the presence of the autologous DCs loaded with either the TRAG-3 protein or the NY-ESO-1 protein. Spots were developed and counted by computer-assisted video image analysis. Each bar represents the mean spot number of triplicates \pm SD with 10⁴ CD4⁺ T cells initially seeded per well. *, $p < 0.05$ were considered significant. Data from one representative experiment of three performed is depicted.



Detection of TRAG-3-specific IFN- γ producing CD4⁺ T cells in the peripheral blood of melanoma and breast cancer but not lung cancer patients

We next wanted to address whether TRAG-3 could stimulate spontaneous CD4⁺ T cell and Ab responses from the blood of patients with TRAG-3-expressing tumors. Therefore, we investigated the blood of 12 patients with melanoma, 13 patients with breast cancers, 14 patients with lung cancers, and 9 normal donors for the presence of CD4⁺ T cells capable of recognizing peptide TRAG-3_{34–48} and peptide HA_{60–73} as control (Table II). CD4⁺ T cells were first isolated from PBLs and stimulated with peptide-pulsed APCs for one round of in vitro stimulation before IFN- γ , IL-5, and IL-10 ELISPOT assays, as described in *Materials and Methods*.

We observed TRAG-3-specific CD4⁺ T cells from 9 of 12 patients with stage IV melanoma (Fig. 4A). All of the nine patients with TRAG-3-specific CD4⁺ T cells had TRAG-3-expressing melanoma as assessed by RT-PCR and shown in Table II. These TRAG-3-specific CD4⁺ T cells were Th1-type CD4⁺ T cells for six of nine patients and Th0-type CD4⁺ T cells for the remaining three patients. We also detected HA-specific CD4⁺ T cells in 11 of the 12 melanoma patients (Fig. 4D). Four of thirteen patients with breast cancers had circulating IFN- γ -producing (i.e., Th-1 type) TRAG-3-specific CD4⁺ T cells (Fig. 4B). Two of the patients with TRAG-3-specific CD4⁺ T cells had stage IV disease, and two had stage III disease. HA-specific CD4⁺ T cell responses were evaluated in 9 of the 13 breast cancer patients and were detectable in

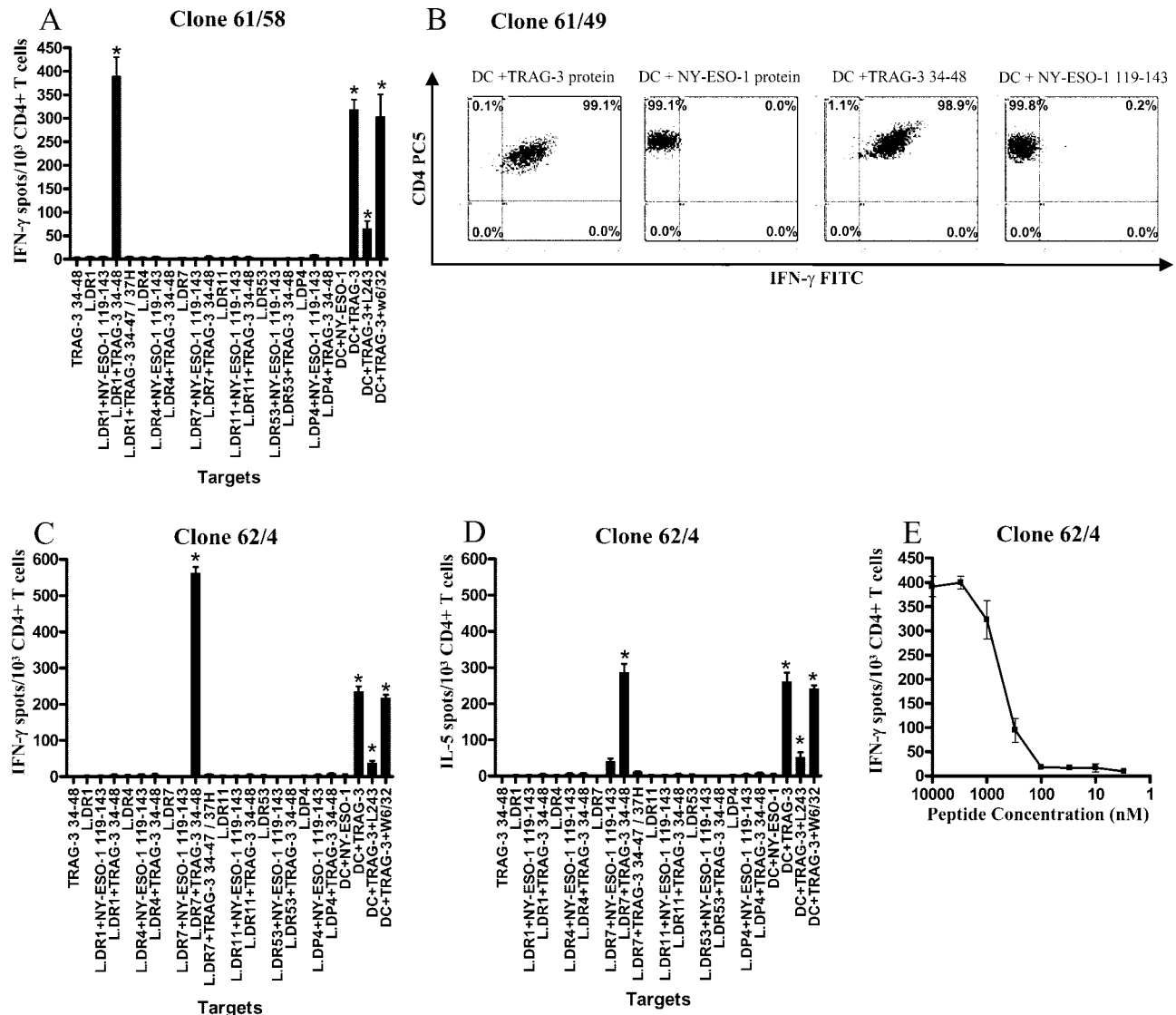


FIGURE 3. Peptide TRAG-3₃₄₋₄₈ stimulates HLA-DR-restricted CD4⁺ T cell clones. The CD4⁺ T cell clones 61/58, 61/49, and 62/4 were obtained by limiting dilution from the TRAG-3₃₄₋₄₈-specific bulk CD4⁺ T cells of patient 1 and donor 1, respectively. **A**, 1000 CD4⁺ T cells from clone 61/58 were incubated in 48-h IFN-γ ELISPOT assays in the presence of peptide NY-ESO-1₃₄₋₄₈ alone (10 μg/ml), L.DR cells or autologous DCs pulsed with either TRAG-3₃₄₋₄₈ (10 μg/ml) or peptide NY-ESO-1₁₁₉₋₁₄₃ (10 μg/ml), and autologous DCs previously loaded with protein TRAG-3 (30 μg/ml) or protein NY-ESO-1 (30 μg/ml). **B**, Clone 61/49 was incubated in IFN-γ and IL-4 cytokine release assays in the presence of autologous DCs pulsed with either peptide TRAG-3₃₄₋₄₈ (10 μg/ml), peptide NY-ESO-1₁₁₉₋₁₄₃ (10 μg/ml), protein TRAG-3 (30 μg/ml), or protein NY-ESO-1 (30 μg/ml). One thousand CD4⁺ T cells from clone 62/4 were incubated in 48-h IFN-γ (**C**) and IL-5 (**D**) assays in the presence of peptide TRAG-3₃₄₋₄₈ alone (10 μg/ml), L.DR cells or autologous DCs pulsed with either peptide TRAG-3₃₄₋₄₈ (10 μg/ml) or peptide NY-ESO-1₁₁₉₋₁₄₃ (10 μg/ml), and autologous DCs previously loaded with protein TRAG-3 (30 μg/ml) or protein NY-ESO-1 (30 μg/ml). **E**, Clone 62/4 was also incubated in the presence of L.DR7 cells pulsed with titrated doses of peptide TRAG-3₃₄₋₄₈. IFN-γ and IL-5 spots were developed and counted by computer-assisted video image analysis. Each bar represents the mean spot number of triplicates ± SD with 10³ CD4⁺ T cells initially seeded per well. *, *p* < 0.05 were considered significant.

3 patients (Fig. 4E). None of the 14 patients with stage IV NSLCC had detectable TRAG-3-specific CD4⁺ T cells (Fig. 4C). HA-specific CD4⁺ T cell responses were analyzed from nine patients and were detectable in only two patients (Fig. 4F). Of note and as controls, none of the nine normal donors had detectable TRAG-3-specific CD4⁺ T cells (Fig. 4, A–C). HA-specific CD4⁺ T cells were detectable in seven of nine normal donors (Fig. 4, D–F).

To assess the capability of the patients with advanced cancer in this study to develop Abs against CGA-expressing tumors, we have also evaluated the spontaneous NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell and Ab responses in the 12 patients with melanoma. As shown in Fig. 4, G and H, we observed that 4 and 2 of the 12 melanoma

patients had detectable CD4⁺ T cells against peptides NY-ESO-1₈₇₋₁₁₁ and NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀, respectively. All patients with spontaneous NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cells in this study had circulating anti-NY-ESO-1 Abs detectable with ELISA (Fig. 4, G and H). In sharp contrast to what we observed for NY-ESO-1, none of the patients in this study, including the patients with evidence of TRAG-3-specific CD4⁺ T cells, had circulating TRAG-3-specific Abs detectable by ELISA (Table II). As a positive control, we have generated anti-TRAG-3 and anti-NY-ESO-1 rabbit polyclonal Abs that showed similar levels of reactivity in ELISAs against the recombinant TRAG-3 protein and the recombinant NY-ESO-1 protein, respectively. The anti-TRAG-3 polyclonal Ab also

Table II. HLA typing, stage of disease, taxane treatment, TRAG-3 expression in tumors, and TRAG-Ab status of the patients evaluated in the study

| Patient | HLA-DR | Stage of Disease | Taxane Treatment | RT-PCR TRAG-3 | TRAG-3 Ab |
|------------------------|-----------------|---|------------------|---------------|-----------|
| Melanoma patients | | | | | |
| 1 | 0401 | IV | No | + | — |
| 2 | 0401 | IV | No | + | — |
| 3 | 0401 | IV | No | — | — |
| 4 | 0401 | IV | No | + | — |
| 5 | 0401 | IV | No | — | — |
| 6 | 0401 | IV | No | + | — |
| 7 | 0401 | IV | No | + | — |
| 8 | 0401 | IV | No | + | — |
| 9 | 0401 | IV | No | + | — |
| 10 | 0401 | IV | No | — | — |
| 11 | 0401 | IV | No | — | — |
| 12 | 0401 | IV | No | + | — |
| Breast cancer patients | | | | | |
| 13 | NA ^a | T ₂ N ₁ M ₀ | Yes | NA | — |
| 14 | 0701, 1302 | IV | Yes | NA | — |
| 15 | 1502, 1501 | IV | Yes | NA | — |
| 16 | 0101, 1401 | IV | Yes | NA | — |
| 17 | 0403, 0701 | T ₁ N ₀ M ₀ | No | NA | — |
| 18 | 1302, 1301 | T ₂ N ₁ M ₀ | Yes | NA | — |
| 19 | NA | T ₁ N ₀ M ₀ | No | NA | — |
| 20 | NA | IV | Yes | NA | — |
| 21 | 0401 | IV | Yes | NA | — |
| 22 | 1104, 1501 | T ₂ N ₁ M ₀ | No | NA | — |
| 23 | 0103 | T ₁ N ₀ M ₀ | No | NA | — |
| 24 | NA | T ₁ cN ₀ M ₀ | No | NA | — |
| 25 | 0103, 1501 | T ₁ N ₀ M ₀ | No | NA | — |
| Lung cancer patients | | | | | |
| 26 | 0301, 1301 | IV | Yes | NA | — |
| 27 | 0701, 1501 | IV | Yes | NA | — |
| 28 | 0404, 0701 | IV | No | NA | — |
| 29 | NA | III | Yes | NA | — |
| 30 | 0405, 1301 | IV | Yes | NA | — |
| 31 | 0301, 0701 | IV | Yes | NA | — |
| 32 | 0701, 1501 | IV | Yes | NA | — |
| 33 | 0401, 0901 | IV | Yes | NA | — |
| 34 | NA | IV | Yes | NA | — |
| 35 | 0301, 1502 | IV | Yes | NA | — |
| 36 | NA | IV | Yes | NA | — |
| 37 | 0101 | IV | Yes | NA | — |
| 38 | 0404, 1301 | IV | No | NA | — |
| 39 | 0802, 1201 | IV | Yes | NA | — |
| Normal donors | | | | | |
| 40 | 0401, 1401 | | | | — |
| 41 | 0701, 0701 | | | | — |
| 42 | 0701, 1101 | | | | — |
| 43 | 0401, 1302 | | | | — |
| 44 | 0301, 0701 | | | | — |
| 45 | 1302, 1501 | | | | — |
| 46 | 0401, 1102 | | | | — |
| 47 | 0701, 1301 | | | | — |
| 48 | 1101, 1301 | | | | — |

^aNA, Not available; TNM, tumor-nodes-metastasis classification.

labeled TRAG-3-expressing paraffin-embedded tumor samples as well as TRAG-3-expressing tumor cell lines (as assessed by RT-PCR) and TRAG-3-transfected COS cells (data not shown).

We next investigated whether our immunological findings were correlated with taxane therapy (Table II). Eight of the thirteen breast cancer patients received taxanes, but only two patients previously treated with taxanes developed TRAG-3-specific CD4⁺ T cells. Twelve of fourteen lung cancer patients were previously treated with taxanes; none of them developed TRAG-3-specific CD4⁺ T cells. Most importantly, none of the nine melanoma patients with TRAG-3-expressing tumors and TRAG-3-specific CD4⁺ T cells had received taxanes.

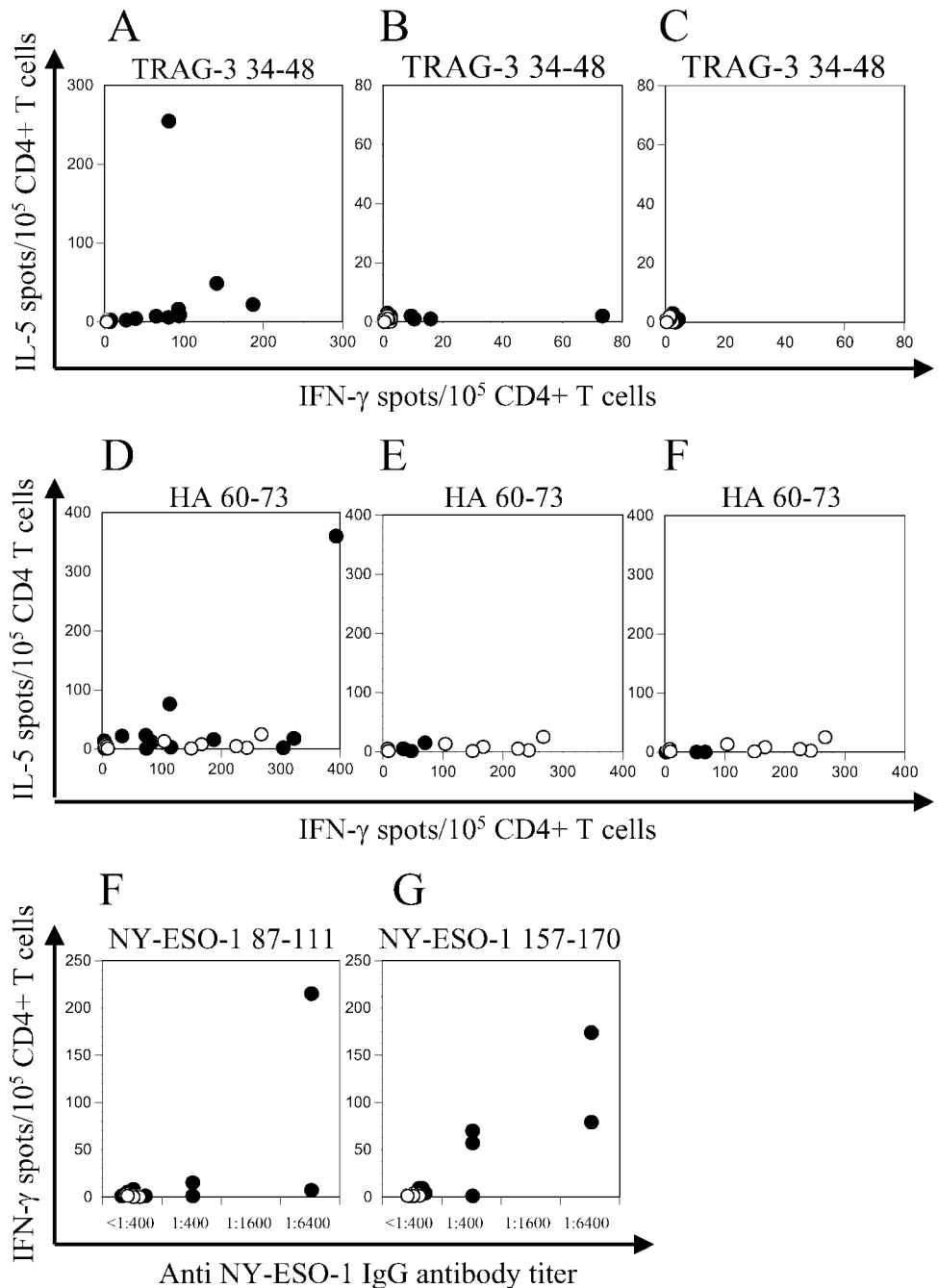
Altogether, our data demonstrate the existence of spontaneous TRAG-3-specific CD4⁺ T cells in all stage IV melanoma patients

with TRAG-3-expressing melanoma and in a limited number of patients with stage III/IV breast cancers but not in any of the patients with stage IV lung cancers. Furthermore, no circulating TRAG-3-specific Abs have been detected from the blood of these patients, although some of these patients had NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell responses that coexist with the presence of circulating anti-NY-ESO-1 Abs.

TCR β CDR3 studies of TRAG-3-specific CD4⁺ T cell clones

To study the diversity of the T cell repertoire of the TRAG-3-specific CD4⁺ T cells, we have cloned and sequenced the TCR β CDR3 gene region of 10 different CD4⁺ T cell clones isolated either from patient 1 or normal donor 1 as previously described in *Materials and Methods*. The data are presented in Table III. We

FIGURE 4. TRAG-3-specific Th1-type vs Th2-type immunoreactivity of CD4⁺ T cells in patients with melanoma, breast, and lung cancers. CD4⁺ T cells were isolated from the peripheral blood of patients with melanoma, breast, and lung cancers and normal donors and then stimulated with autologous APCs pulsed with peptide TRAG-3_{34–48}, peptide HA_{60–73}, peptide NY-ESO-1_{87–111}, or peptide NY-ESO-1_{157–170}. CD4⁺ T cells were then analyzed in IFN- γ and IL-5 ELISPOT assays for their reactivity to autologous T-APCs pulsed with: peptide TRAG-3_{34–48} (A–C); peptide HA_{60–73} (D–F), for melanoma, breast cancer, and lung cancer patients, respectively. Each symbol represents the combined IFN- γ and IL-5 ELISPOT data for each individual patient with melanoma, breast cancer, or lung cancer (●) and each normal donor (○). ELISA for NY-ESO-1-specific Abs were performed as previously reported in the section *Materials and Methods* (all data <1/400 are considered negative). We have also presented the combined data of anti-NY-ESO-1 Ab and IFN- γ ELISPOT assays from melanoma patients and normal donors for: peptide NY-ESO-1_{87–111} (F) and peptide NY-ESO-1_{157–170} (G). Each symbol represents the combined IFN- γ ELISPOT and NY-ESO-1-specific Abs data for each individual melanoma patient (●) or normal donor (○).



observed that the 10 clones isolated from patient 1 exhibited 1 unique TCR β CDR3 region, whereas the TRAG-3-specific CD4⁺ T cell clones derived from normal donor 1 expressed 3 distinct TCR β CDR3 regions.

Altogether, our data suggest a limited TCR repertoire of TRAG-3-specific CD4⁺ T cells in patients with TRAG-3-expressing tumors.

Discussion

In the present study, we investigated the CD4⁺ T cell responses against the CGA TRAG-3, commonly expressed by the majority of melanomas, breast cancers, and NSCLC. We observed that a single immunodominant epitope, TRAG-3_{34–48}, bound to multiple HLA-DR molecules including *HLA-DRB1*0101*, *HLA-DRB1*0401*, *HLA-DRB1*0701*, *HLA-DRB1*1101*, *HLA-DRB1*1501*, and *HLA-DRB5*0101* and stimulated autologous

CD4⁺ T cells from normal donors and melanoma patients when presented in the context of these HLA molecules. Because peptide TRAG-3_{28–42} binds to *HLA-DRB1*0301* and *HLA-DRB1*1301* and peptide TRAG-3_{34–48} binds to *HLA-DRB1*1501*, it is expected that the 21-mer TRAG-3_{28–48} may represent a more promiscuous HLA-DR-binding sequence that binds to the three HLA-DR alleles.

Importantly, TRAG-3-specific CD4⁺ T cells recognized autologous DCs previously loaded with the TRAG-3 protein but not with an irrelevant protein, thus indicating that peptide TRAG-3_{34–48} encompasses one naturally processed and presented epitope. Our findings contrast with previous studies showing that CGAs usually give rise to multiple MHC class II epitopes recognized by CD4⁺ T cells (8–10, 12, 17, 18), reporting the first example of tumor Ag-specific CD4⁺ T cell responses directed against a single immunodominant epitope. The selectivity of the T

Table III. *TCR β CDR3 sequences from TRAG-3-specific CD4⁺ T cell clones*

| Donor | Clones | | V β | NDN | J β | |
|----------------|--|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------------|
| Patient 1 | 61/6, 61/7, 61/11, 61/18, 61/28 61/32, 61/35, 61/41, 61/57, 61/58 | T-CRBV20-1 | CSAW | GGLN | TDTQYF | T-CRBJ2-3 |
| Normal donor 1 | 62/4, 62/52 | T-CRBV24-1 | CATSD | PGTG | TEKLF | T-CRBJ1-4 |
| | 62/3, 62/5, 62/18, 62/39, 62/43 | T-CRBV19 | CASS | MGQGYFKRP | YNEQF | T-CRBJ2-1 |
| | 62/8, 62/19, 62/25 | T-CRBV4-1 | CASSQ | ETT | YGYTF | T-CRBJ1-2 |

cells to respond to a very limited number of peptides within complex protein Ags is called immunodominance (37). A number of mechanisms appear to contribute to immunodominance including events related to Ag processing and presentation as well as T cell recognition (38). Our binding data on TRAG-3, showing that a single amino acid region is capable of binding to multiple HLA-DR molecules, strongly support the pivotal role of HLA-binding properties for the determinant selection of the immunodominant peptide, TRAG-3_{34–48} (37, 39). Furthermore, our data support the hypothesis that immunodominance is correlated with binding to multiple MHC class II molecules. The correlation between highly degenerate HLA-DR binding and immunodominance has been previously established for a number of epitopes derived from foreign and self-Ags (40–45). Such a correlation is also suggested by a recent study in cancer patients showing that the spontaneous NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell responses are directed toward two immunodominant and promiscuous HLA-DR-restricted peptides, NY-ESO-1_{81–100} and NY-ESO-1_{119–143}, previously identified by us and others (8, 9, 18, 46).

There is now ample evidence that some CGAs may spontaneously give rise to T cell and Ab responses in patients with CGA-expressing tumors (18, 19, 47–49). Whenever detectable, spontaneous immune responses to CGAs were found only in a fraction of the patients with CGA-expressing tumor. In contrast, our findings show that all patients with TRAG-3-expressing stage IV melanoma had spontaneous TRAG-3-specific CD4⁺ T cells, supporting the strong immunogenicity of TRAG-3. This observation may not apply to all types of CGA-expressing tumors as spontaneous CD4⁺ T cell responses against TRAG-3 were found in only four tested stage III/IV breast cancer patients and in none of the tested patients with stage IV NSCLC. We have not investigated TRAG-3 expression in the primary tumor or metastases of the breast cancer and NSCLC patients and cannot rule out that few breast tumors and none of the 14 lung cancer patients' tumors expressed TRAG-3. However, this seems very unlikely given that previous works have demonstrated that ~60 and 54% of breast cancers and NSLCC express TRAG-3, respectively (21, 22). Furthermore, as only three of nine and two of nine patients with breast cancers and stage IV NSCLC, respectively, developed HA-specific CD4⁺ T cells, we also cannot exclude that the capability of the Ag-specific CD4⁺ T cells to produce cytokines may have been impaired because of their clinical status or ongoing chemotherapy.

To investigate a correlation between the presence of TRAG-3-specific CD4⁺ T cells and TRAG-3-specific IgG Ab, we studied the occurrence of spontaneous humoral responses to TRAG-3 and NY-ESO-1 (as a control) with ELISA. Whereas the stage IV melanoma patients in this study with naturally occurring NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cells had circulating Abs against NY-ESO-1, none of the patients with spontaneous TRAG-3-specific CD4⁺ T cells had detectable Ab responses against TRAG-3. Our observation of IFN- γ -producing CD4⁺ T cells in the absence of circulating TRAG-3-specific Abs clearly indicates that spontaneous CGA-specific CD4⁺ T cells may exist independently of the presence of CGA-specific circulating Abs, revealing a novel profile of spon-

taneously acquired immune response against CGAs. Interestingly, four of the melanoma patients with TRAG-3-specific CD4⁺ T cells also had circulating NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cells and NY-ESO-1-specific Abs, suggesting that CGA-specific CD4⁺ T cells within the same individual may differ in their capability to activate B cells and promote CGA-specific IgG Abs.

Two previous experimental studies in animals have suggested that the diversity of the CD4⁺ T cell repertoire plays a critical role in the generation of isotype-switched IgG autoantibodies (50, 51). Another study in humans has reported the existence of Th2-type CD4⁺ T cells directed against a single immunodominant epitope from mugwort pollen in allergic patients, which coexisted with Ag-specific IgE Abs and exhibited a large TCR repertoire (52). These observations led us to examine the TCR repertoire of the TRAG-3-specific CD4⁺ T cells derived from PBL of either a melanoma patient with TRAG-3-expressing tumor or a normal donor. We observed that all 10 clones derived from the melanoma patient exhibited the same TCR β CDR3 region, whereas 3 distinct TCR β CDR3 regions were found among the 10 CD4⁺ T cell clones derived from the normal donor. Although we cannot exclude a selective in vitro expansion of one specific CD4⁺ T cell clone that occurred only for the melanoma patient, our data suggest an in vivo selection of one specific T cell clonotype in the melanoma patient with TRAG-3-expressing tumor. It is thus possible that the help provided by the TRAG-3-specific CD4⁺ T cells is of limited specificity and less likely to promote a sustained effector B cell response and Ab production in patients with TRAG-3-expressing tumors. Further TCR studies of TRAG-3-specific CD4⁺ T cells from a larger number of patients with TRAG-3-expressing tumors are needed to confirm our findings in one melanoma patient.

Whenever detectable, the TRAG-3-specific CD4⁺ T cells obtained from patients with melanoma and breast cancers were either Th1-type or Th0-type CD4⁺ T cells because they produced IFN- γ , or IFN- γ and IL-5, respectively. We have not identified TRAG-3-specific CD4⁺ T cells or clones that produced only Th2-type cytokines, suggesting no Th2 skewing of the spontaneous TRAG-3-specific CD4⁺ T cell responses as previously reported for MAGE-6 (53). These findings are in line with our previous studies of NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cells in patients with active NY-ESO-1-expressing melanoma (12). They illustrate that Th2 skewing is not a phenomenon that is generalized for all CGA-specific CD4⁺ T cell responses in cancer patients.

The majority of the breast cancer and lung cancer patients in this study have been treated with taxane-based chemotherapy, which might be expected to induce TRAG-3 expression by the patients' tumor. However, and as indicated in Table II, we have not found that taxane-based treatment induced spontaneous immune responses against TRAG-3 in vivo. Furthermore, none of the patients with stage IV melanoma in this study with TRAG-3-expressing tumors and TRAG-3-specific CD4⁺ T cells had previously received taxanes. These findings strongly suggest that taxanes play no major role in the expression of TRAG-3 or in the induction of TRAG-3-specific CD4⁺ T cells.

In summary, this study reports a novel immunological pattern of CGA-specific immune responses and adds to the diversity of spontaneous immune responses in patients with CGA-expressing tumors. Because of the common expression of TRAG-3 by melanoma and its strong spontaneous immunogenicity in patients with stage IV melanoma, the TRAG-3_{34–48} epitope represents a good candidate for the monitoring and the dissection of tumor Ag-specific spontaneous immune responses in patients with advanced melanoma.

Acknowledgments

We are grateful to the patients and their physicians for giving time and the blood samples for the performance of these experiments. We thank Drs. L. J. Old and G. Ritter (Ludwig Institute for Cancer Research, New York, NY) for providing the NY-ESO-1 protein. We also thank Peggy Chocarne and Aurelien Missonnier (CEA-Saclay, France) for technical help.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath, and S. P. Schoenberger. 2003. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* 421: 852–856.
- Sun, J. C., and M. J. Bevan. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300: 339–342.
- Rocha, B. 2002. Requirements for memory maintenance. *Nat. Immunol.* 3: 209–210.
- Rocha, B., and C. Tanchot. 2004. Towards a cellular definition of CD8⁺ T-cell memory: the role of CD4⁺ T-cell help in CD8⁺ T-cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 259–263.
- Wang, R. F., X. Wang, A. C. Atwood, S. L. Topalian, and S. A. Rosenberg. 1999. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science* 284: 1351–1354.
- Wang, R. F., X. Wang, and S. A. Rosenberg. 1999. Identification of a novel major histocompatibility complex class II-restricted tumor antigen resulting from a chromosomal rearrangement recognized by CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 189: 1659–1668.
- Zarour, H. M., J. M. Kirkwood, L. S. Kierstead, W. Herr, V. Brusic, C. L. Slingluff, Jr., J. Sidney, A. Sette, and W. J. Storkus. 2000. Melan-A/MART-1(51–73) represents an immunogenic HLA-DR4-restricted epitope recognized by melanoma-reactive CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 400–405.
- Zarour, H. M., B. Maillere, V. Brusic, K. Coval, E. Williams, S. Pouvell-Moratille, F. Castelli, S. Land, J. Bennouna, T. Logan, and J. M. Kirkwood. 2002. NY-ESO-1 119–143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4⁺ T cells. *Cancer Res.* 62: 213–218.
- Zarour, H. M., W. J. Storkus, V. Brusic, E. Williams, and J. M. Kirkwood. 2000. NY-ESO-1 encodes DRB1*0401-restricted epitopes recognized by melanoma-reactive CD4⁺ T cells. *Cancer Res.* 60: 4946–4952.
- Mandic, M., C. Almunia, S. Vicel, D. Gillet, B. Janjic, K. Coval, B. Maillere, J. M. Kirkwood, and H. M. Zarour. 2003. The alternative open reading frame of LAGE-1 gives rise to multiple promiscuous HLA-DR-restricted epitopes recognized by T-helper 1-type tumor-reactive CD4⁺ T cells. *Cancer Res.* 63: 6506–6515.
- Zeng, G., X. Wang, P. F. Robbins, S. A. Rosenberg, and R. F. Wang. 2001. CD4⁺ T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3964–3969.
- Mandic, M., F. Castelli, B. Janjic, C. Almunia, P. Andrade, D. Gillet, V. Brusic, J. M. Kirkwood, B. Maillere, and H. M. Zarour. 2005. One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4⁺ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J. Immunol.* 174: 1751–1759.
- Jager, E., D. Jager, J. Karbach, Y. T. Chen, G. Ritter, Y. Nagata, S. Gnjatich, E. Stockert, M. Arand, L. J. Old, and A. Knuth. 2000. Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101–0103 and recognized by CD4⁺ T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J. Exp. Med.* 191: 625–630.
- Chaux, P., V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A. M. Eggermont, T. Boon, and P. van der Bruggen. 1999. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4⁺ T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 189: 767–778.
- Schultz, E. S., B. Lethe, C. L. Cambiaso, J. Van Snick, P. Chaux, J. Corthals, C. Heirman, K. Thielemans, T. Boon, and P. van der Bruggen. 2000. A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4⁺ cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res.* 60: 6272–6275.
- Jassim, A., W. Ollier, A. Payne, A. Biro, R. T. Oliver, and H. Festenstein. 1989. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur. J. Immunol.* 19: 1215–1220.
- Ayyoub, M., A. Merlo, C. S. Hesdorffer, D. Rimoldi, D. Speiser, J. C. Cerottini, Y. T. Chen, L. J. Old, S. Stevanovic, and D. Valtorri. 2005. CD4⁺ T cell responses to SSX-4 in melanoma patients. *J. Immunol.* 174: 5092–5099.
- Gnjatic, S., D. Atanackovic, E. Jager, M. Matsuo, A. Selvakumar, N. K. Altorki, R. G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y. T. Chen, A. Knuth, and L. J. Old. 2003. Survey of naturally occurring CD4⁺ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 8862–8867.
- Jager, E., Y. Nagata, S. Gnjatich, H. Wada, E. Stockert, J. Karbach, P. R. Dunbar, S. Y. Lee, A. Jungbluth, D. Jager, et al. 2000. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4760–4765.
- Feller, A. J., Z. Duan, R. Penson, H. C. Toh, and M. V. Seiden. 2000. TRAG-3, a novel cancer/testis antigen, is overexpressed in the majority of melanoma cell lines and malignant melanoma. *Anticancer Res.* 20: 4147–4151.
- Wu, Y. Z., T. T. Zhao, B. Ni, L. Y. Zou, H. L. Liu, and B. Zhu. 2003. Expression of TRAG-3 in breast cancer. *Int. J. Cancer* 107: 167–168.
- Chen, Z., B. Zhu, and Y. Wu. 2002. Expression of TRAG-3 antigen in non-small-cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 38: 101–102.
- Duan, Z., A. J. Feller, H. C. Toh, T. Makastorsis, and M. V. Seiden. 1999. TRAG-3, a novel gene, isolated from a taxol-resistant ovarian carcinoma cell line. *Gene* 229: 75–81.
- Zhu, B., Z. Chen, X. Cheng, and Y. Wu. 2002. Induction of TRAG-3 expression in A549 lung adenocarcinoma cell line by 5-aza-2'-deoxyazacytidine. *Lung Cancer* 38: 321–322.
- Meier, A., S. Reker, I. M. Svane, L. Holten-Andersen, J. C. Becker, I. Sondergaard, M. H. Andersen, and P. Thor Straten. 2005. Spontaneous T-cell responses against peptides derived from the taxol resistance-associated gene-3 (TRAG-3) protein in cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 219–228.
- Zhu, B., Z. Chen, X. Cheng, Z. Lin, J. Guo, Z. Jia, L. Zou, Z. Wang, Y. Hu, D. Wang, and Y. Wu. 2003. Identification of HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from TRAG-3 antigen. *Clin. Cancer Res.* 9: 1850–1857.
- Turvy, D. N., and J. S. Blum. 1998. Detection of biotinylated cell surface receptors and MHC molecules in a capture ELISA: a rapid assay to measure endocytosis. *J. Immunol. Methods* 212: 9–18.
- Watson, A. J., R. DeMars, I. S. Trowbridge, and F. H. Bach. 1983. Detection of a novel human class II HLA antigen. *Nature* 304: 358–361.
- Zarour, H., C. De Smet, F. Lehmann, M. Marchand, B. Lethe, P. Romero, T. Boon, and J. C. Renauld. 1996. The majority of autologous cytolytic T-lymphocyte clones derived from peripheral blood lymphocytes of a melanoma patient recognize an antigenic peptide derived from gene Pmel17/gp100. *J. Invest. Dermatol.* 107: 63–67.
- Texier, C., S. Pouvell, M. Busson, M. Herve, D. Charron, A. Menez, and B. Maillere. 2000. HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. *J. Immunol.* 164: 3177–3184.
- Texier, C., S. Pouvell-Moratille, M. Busson, D. Charron, A. Menez, and B. Maillere. 2001. Complementarity and redundancy of the binding specificity of HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 molecules. *Eur. J. Immunol.* 31: 1837–1846.
- Castelli, F. A., C. Buhot, A. Sanson, H. Zarour, S. Pouvell-Moratille, C. Nonn, H. Gahery-Segard, J. G. Guillet, A. Menez, B. Georges, and B. Maillere. 2002. HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity. *J. Immunol.* 169: 6928–6934.
- Atanackovic, D., M. Matsuo, E. Ritter, G. Mazzara, G. Ritter, E. Jager, A. Knuth, L. J. Old, and S. Gnjatich. 2003. Monitoring CD4⁺ T cell responses against viral and tumor antigens using T cells as novel target APC. *J. Immunol. Methods* 278: 57–66.
- Stockert, E., E. Jager, Y. T. Chen, M. J. Scanlan, I. Gout, J. Karbach, M. Arand, A. Knuth, and L. J. Old. 1998. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J. Exp. Med.* 187: 1349–1354.
- Geneveve, C., A. Diu, J. Nierat, A. Caignard, P. Y. Dietrich, L. Ferradini, S. Roman-Roman, F. Triebel, and T. Hercend. 1992. An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (Vα1-w29/Vβ1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction. *Eur. J. Immunol.* 22: 1261–1269.
- Southwood, S., J. Sidney, A. Kondo, M. F. del Guercio, E. Appella, S. Hoffman, R. T. Kubo, R. W. Chesnut, H. M. Grey, and A. Sette. 1998. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J. Immunol.* 160: 3363–3373.
- Sercarz, E. E., P. V. Lehmann, A. Ametani, G. Benichou, A. Miller, and K. Moudgil. 1993. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 729–766.
- Sant, A. J., F. A. Chaves, S. A. Jenks, K. A. Richards, P. Menges, J. M. Weaver, and C. A. Lazarski. 2005. The relationship between immunodominance, DM editing, and the kinetic stability of MHC class II:peptide complexes. *Immunol. Rev.* 207: 261–278.
- Rosenthal, A. S. 1978. Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response. *Immunol. Rev.* 40: 136–152.
- Sinaglia, F., M. Guttinger, J. Kilgus, D. M. Doran, H. Matile, H. Etlinger, A. Trzeciak, D. Gillesen, and J. R. Pink. 1988. A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules. *Nature* 336: 778–780.
- Panina-Bordignon, P., A. Tan, A. Termijtlen, S. Demotz, G. Corradin, and A. Lanzavecchia. 1989. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous

- binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur. J. Immunol.* 19: 2237–2242.
42. Ferrari, C., A. Bertoletti, A. Penna, A. Cavalli, A. Valli, G. Missale, M. Pilli, P. Fowler, T. Giuberti, F. V. Chisari, et al. 1991. Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J. Clin. Invest.* 88: 214–222.
43. Valli, A., A. Sette, L. Kappos, C. Oseroff, J. Sidney, G. Miescher, M. Hochberger, E. D. Albert, and L. Adorini. 1993. Binding of myelin basic protein peptides to human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules and their recognition by T cells from multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 91: 616–628.
44. Diepolder, H. M., J. T. Gerlach, R. Zachoval, R. M. Hoffmann, M. C. Jung, E. A. Wierenga, S. Scholz, T. Santantonio, M. Houghton, S. Southwood, A. Sette, and G. R. Pape. 1997. Immunodominant CD4⁺ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 71: 6011–6019.
45. Tangri, S., B. R. Mothe, J. Eisenbraun, J. Sidney, S. Southwood, K. Briggs, J. Zinckgraf, P. Bilsel, M. Newman, R. Chesnut, C. Licalsi, and A. Sette. 2005. Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. *J. Immunol.* 174: 3187–3196.
46. Ayyoub, M., N. E. Souleimanian, E. Godefroy, L. Scotto, C. S. Hesdorffer, L. J. Old, and D. Valmori. 2006. A phenotype based approach for the immune monitoring of NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell responses in cancer patients. *Clin. Immunol.* 118: 188–194.
47. Ayyoub, M., D. Rimoldi, P. Guillaume, P. Romero, J. C. Cerottini, D. Valmori, and D. Speiser. 2003. Tumor-reactive SSX-2-specific CD8⁺ T cells are selectively expanded during immune responses to antigen-expressing tumors in melanoma patients. *Cancer Res.* 63: 5601–5606.
48. Bricard, G., H. Bouzourene, O. Martinet, D. Rimoldi, N. Halkic, M. Gillet, P. Chaubert, H. R. Macdonald, P. Romero, J. C. Cerottini, and D. E. Speiser. 2005. Naturally acquired MAGE-A10- and SSX-2-specific CD8⁺ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Immunol.* 174: 1709–1716.
49. Valmori, D., V. Dutoit, D. Lienard, D. Rimoldi, M. J. Pittet, P. Champagne, K. Ellefsen, U. Sahin, D. Speiser, F. Lejeune, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2000. Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8⁺ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res.* 60: 4499–4506.
50. Busser, B. W., M. P. Cancro, and T. M. Laufer. 2004. An increased frequency of autoantibody-inducing CD4⁺ T cells in pre-diseased lupus-prone mice. *Int. Immunol.* 16: 1001–1007.
51. Peng, S. L., S. Fatenejad, and J. Craft. 1996. Induction of nonpathologic, humoral autoimmunity in lupus-prone mice by a class II-restricted, transgenic $\alpha\beta$ T cell: separation of autoantigen-specific and -nonspecific help. *J. Immunol.* 157: 5225–5230.
52. Jahn-Schmid, B., P. Kelemen, M. Himly, B. Bohle, G. Fischer, F. Ferreira, and C. Ebner. 2002. The T cell response to Art v 1, the major mugwort pollen allergen, is dominated by one epitope. *J. Immunol.* 169: 6005–6011.
53. Tatsumi, T., L. S. Kierstead, E. Ranieri, L. Gesualdo, F. P. Schena, J. H. Finke, R. M. Bukowski, J. Mueller-Berghaus, J. M. Kirkwood, W. W. Kwok, and W. J. Storkus. 2002. Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4⁺ T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401⁺ patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J. Exp. Med.* 196: 619–628.

Chapitre 5

Survivine : une cible pour les nouvelles thérapies anti-cancéreuses

La Survivine a été découverte en 1997 et est un membre de la famille IAP (inhibitor of apoptosis) [Ambrosini et al., 1997]. Cette protéine bifonctionnelle règle la division cellulaire et supprime l'apoptose. Elle est exprimée abondamment dans les tissus foetaux, mais n'est trouvée qu'en faible quantité dans la plupart des tissus normaux différenciés. En revanche, elle est sélectivement surexprimée dans la plupart des cellules néoplastiques et semble être impliquée dans la résistance des cellules tumorales à des agents anticancéreux et aux radiations ionisantes. Ces propriétés font de la Survivine une cible attrayante pour les nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

5.1 Notions générales relatives à la Survivine

Avec 16.5 kDa, la Survivine est le membre le plus petit de la famille d'IAP. Structuralement cette protéine contient un domaine "Baculovirus IAP Repeat" (BIR) qui présente un motif à doigt de zinc de 70 acides aminés (domaine caractéristique de tous les membres de la famille IAP) et une extrémité C-terminale en hélice α . Une simple copie du gène est localisée sur le chromosome humain 17q25 (11 E2 chez la souris) qui donne naissance à quatre transcrits épissés de façon alternative : les transcrits de la Survivine sauvage (142 acides aminés), et deux isoformes générées par l'insertion alternative de l'exon 2 (Survivine-2 β , 165 aa) ou l'élimination de l'exon 3 (Survivine- Δ Ex-3)(Fig. 5.1). La forme Survivine-3 β (120aa) récemment découvert résulte de

l'introduction d'un nouvel exon-3 β . Les fonctions différentielles des variants de la Survivine sont peu connues. Cependant, des données préliminaires suggéreraient que l'hétérodimerisation de la Survivine avec la Survivine- Δ Ex-3 soit essentielle pour l'inhibition de l'apoptose dépendant de mitochondrie. De plus il a été démontré dans des essais d'expression exogène que la Survivine- 2 β atténue l'activité anti-apoptotique de la Survivine [Zaffaroni et al., 2005].

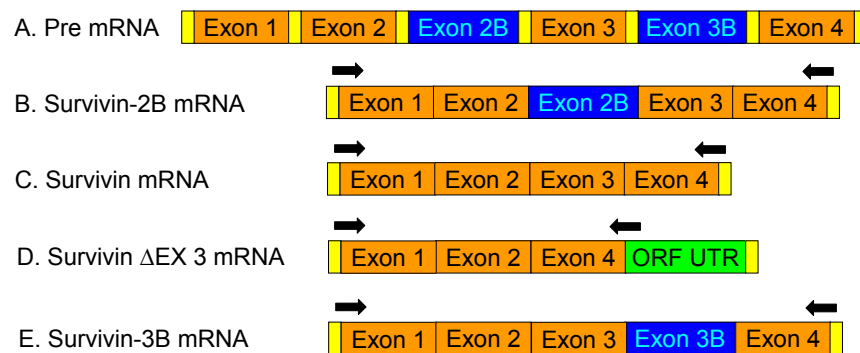


FIG. 5.1: Survivine et ses variantes épissés, Survivine-2 β , Survivine- Δ Ex-3, Survivine-3 β .

(A) Le pre-mRNA de la Survivine a quatre exons et deux exons supplémentaires 2 β et 3 β . (B) Le mRNA de la Survivine-2 β a quatre exons et un exon-2 β supplémentaire. (C) Le mRNA de la Survivine a chacun des quatre exons, mais pas exon-2 β et exon-3 β supplémentaire. (D) Le mRNA de la Survivine- Δ EX 3 a trois exons (exon 1, 2, 4) mais pas exon 2 et exon-3 β supplémentaire. (E) Le mRNA de la Survivine-3 β a quatre exons (exon 1, 2, 3, 4) et un exon supplémentaire 3 β .

La Survivine endogène existe dans des sous-compartiments cellulaires, comportant une fraction cytosolique prédominante et une fraction plus petite nucléaire. la Survivine sauvage et la Survivine-2 β sont principalement cytoplasmiques, tandis que la Survivine- Δ Ex-3 est principalement nucléaire. La localisation et l'analyse fonctionnelle de la Survivine-3 β n'ont pas été encore décrites. Ces différentes isoformes de la Survivine et leur localisation respective dans la cellule peuvent représenter un équilibre régulateur entre l'apoptose et l'inhibition de l'apoptose [Zaffaroni et al., 2005].

5.2 Rôle de la Survivine dans la division cellulaire

La Survivine est essentielle à l'exécution correcte de la mitose et à la division cellulaire. Son expression spécifique est maximale en phase G2/M. Pendant la mitose, la Survivine se lie aux microtubules du fuseau mitotique par son hélice α située en C-terminale. L'interférence de l'interaction Survivine/microtubule au moyen d'ADN antisense, a comme conséquence un échec de la fonction antiapoptotique de la Survivine et une augmentation de l'activité caspase-3 qui est impliquée dans l'apoptose. La suppression de la fonction de la Survivine a également provoqué des défauts de division de cellules tels que l'apparition de centrosomes supernuméraires, la formation de fuseaux mitotiques multipolaires, et l'apparition de cellules polyploïdes et multinucléaires [Johnson and Howerth, 2004].

5.3 Rôle de la Survivine dans l'apoptose

Les protéines de la famille des IAP sont définies par la présence au moins d'un domaine BIR et par la capacité d'empêcher l'apoptose. Généralement, les IAPs de mammifère interviennent sur l'apoptose par l'inhibition directe ou indirecte de l'initiateur de la caspase-9 ou des caspases effecteurs terminales comme les caspase-3 et caspase-7 via leur BIR domaine. Par exemple, la protéine XIAP se lie et inhibe la caspase-9 par son troisième BIR domaine (BIR3), tandis que la caspase-3 et la caspase-7 sont inhibés par l'intermédiaire d'une région entre BIR1 et BIR2. Le mécanisme précis par lequel la Survivine inhibe l'apoptose est encore incomplètement connu. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer le mécanisme par lequel la Survivine inhibe l'apoptose (Fig. 5.2) [Johnson and Howerth, 2004]. D'abord, la suppression directe de la caspase-3 par la Survivine a été proposée par quelques investigateurs. Cependant, la Survivine ne possède pas le domaine structural présent, chez d'autres IAPs, qui permettent la liaison à la caspase-3. Il a également été proposé que la Survivine se lie à la caspase-9. Cependant, il y a aussi des problèmes avec cette théorie. La phosphorylation sur la thréonine à la position 34 (Thr34) est critique pour la fonction de la Survivine. Cependant, la phosphorylation de la Survivine n'explique pas pourquoi ceci favoriserait l'interaction avec le caspase-9. Enfin, la Survivine peut inhiber des caspases de manière indirecte. La Survivine se fixe sur Smac/DIABLO qui

se comporte comme une protéine proapoptique car elle active la caspase-9. La fixation de la Survivine à Smac/DIABLO doit antagoniser la capacité proapoptotique du Smac/DIABLO et donc inhiber l'apoptose [Johnson and Howerth, 2004].

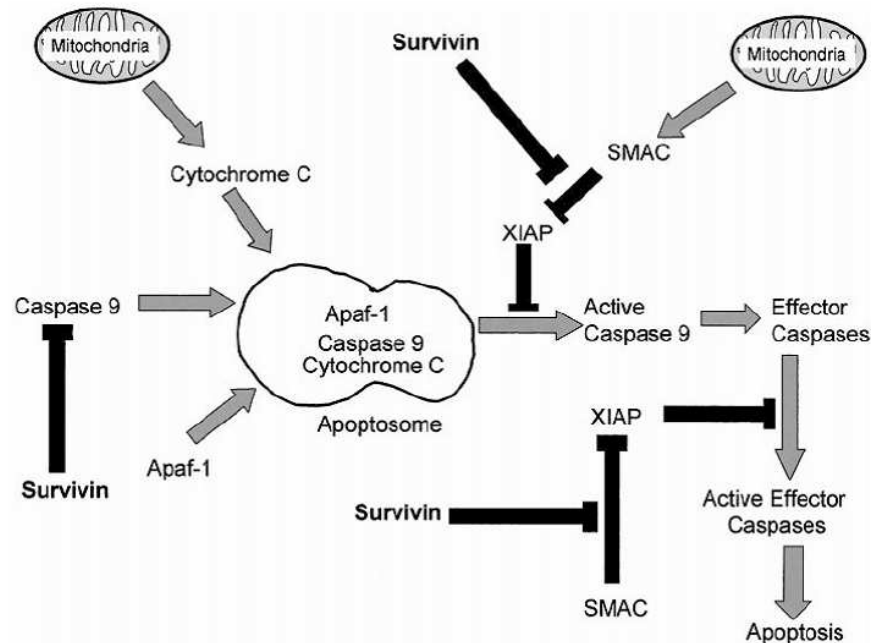


FIG. 5.2: Mécanismes potentiels par lesquels la Survivine inhibe l'apoptose.

La Survivine peut inhiber l'apoptose en liant la caspase-9 ou il peut bloquer le Smac, de ce fait inhibant cette protéine proapoptotique de bloquer les protéines d'IAP.

5.4 Expression de la Survivine et résistance aux agents anticancéreux

La Survivine est fortement exprimée dans des organes foetaux. Elle n'est généralement pas fortement exprimée dans les tissus normaux à l'exception du thymus, des cellules endothéliales du côlon et des cellules souches neuronales [Zaffaroni et al., 2005]. Plusieurs études ont démontré la surexpression de la Survivine dans une vaste majorité de cancers humains : sein, foie, mélanomes, colon, poumon, ovaire, utérus, oesophage, estomac, pancréas, foie, maladie de Hodgkin, lymphome non hodgkinien, leucémie, syndrome myélodysplasique avec anémie réfractaire, neuroblastome, phéochromocytome, sarcomes des tissus mous, tumeurs cérébrales. La surexpression de la

Survivine est invariablement associée à des types de tumeurs plus agressives et à un pronostic plus mauvais que les tumeurs n'exprimant pas la Survivine.

L'apoptose est le mode principal de mort cellulaire induite par plusieurs classes d'agents anticancéreux et par l'irradiation ionisante comme le rayon gamma. Aussi, la Survivine a été rapidement suspectée comme participant à la résistance des cellules tumorales à ces traitements. De fait, Asanuma et al. [Song et al., 2003] ont montré que la Survivine agit comme un facteur constitutif de radio-résistance dans les cellules du cancer pancréatique. En étudiant un ensemble de lignées cellulaires, ils ont observé un rapport inverse entre l'expression de mRNA de la Survivine et la sensibilité in vitro à l'irradiation par des rayons X. Ils ont également démontré que l'expression de l'ARNm de la Survivine est augmentée sous l'effet de doses de rayons X sub-létales. Ceci suggère que la protéine agit également en tant que facteur inductible de radiorésistance. De plus, comme la Survivine est associée aux microtubules et au fuseau mitotique, elle a également été suspectée de rendre les cellules résistantes aux agents qui agissent sur le microtubule. Ainsi, Li et al. [Junj-Kuang et al., 2002] ont démontré que la transfection de la Survivine protège efficacement les fibroblastes murins 3T3 contre l'apoptose induit par le taxol, un agent qui stabilise le microtubule.

5.5 Signification pronostique et diagnostique de la Survivine

La Survivine est une des quelques protéines, qui ont différenciellement exprimées dans les cellules tumorales et la plupart des tissus normaux. Cette caractéristique lui permet d'être un marqueur potentiel de cancer. La surexpression de la Survivine chez les patients atteints de cancer est liée à une diminution de l'espérance de vie, et à un taux plus élevé de réapparition de tumeurs résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Une corrélation positive a été ainsi établie entre l'expression de la Survivine et le taux élevé de prolifération tumorale et le taux diminué de sensibilité à l'apoptose. Un nombre croissant de publications suggèrent que l'expression nucléaire de la Survivine serait un marqueur pronostique meilleur et plus fiable [Sah et al., 2006].

L'expression de la Survivine peut être évaluée dans les tumeurs par des méthodes

immunohistochimiques, ce qui est un indicateur pronostique rapide. La Survivine peut être également détectée dans les fluides biologiques des patients atteints de cancer. Dans le cas particulier du cancer de la vessie, la Survivine peut être détectée dans l'urine des patients [Sah et al., 2006]. En outre, les anticorps anti-Survivine ont été détectés chez des patients de cancer du colon et du poumon ce qui suggère qu'un test sérologique pourrait être employé comme outil diagnostique [Altieri, 2001, Rohayem et al., 2000].

5.6 Intérêt thérapeutique de la Survivine

Beaucoup d'approches ont été tentées afin de diminuer l'expression de la Survivine *in vivo* et *in vitro*. L'expression de la Survivine peut être bloquée par les techniques anti-sense ou de siRNA. Plusieurs compagnies telles que Isis pharmaceutique, CST recherchent des produits de ce type qui ciblent la Survivine pour empêcher la croissance de tumeur et pour induire l'apoptose des cellules tumorales. L'expression de la Survivine est également empêchée par le ribozyme. Le mRNA spécifique de la Survivine subit en effet le clivage à l'extrémité 3' par le ribozyme. Ce traitement entraîne l'inhibition de la traduction et par conséquent le retardement de la croissance de tumeur [Zaffaroni et al., 2005]. La thérapie génique employant les mutants dominants négatifs de la Survivine semblent également donner de bons résultats cliniques. L'expérience utilisant le mutant Thr34-Ala non phosphorylé de la Survivine a causé l'apoptose spontanée dans les lignées cellulaires du col de l'utérus, de la prostate, du poumon et du cancer colorectal et dans des modèles de xenogreffe du sein. La Survivine sauvage est phosphorylée sur la thréonine Thr34 par cdc2 qui est la kinase de la cycline B1 [Sah et al., 2006]. Cette forme phosphorylée de la Survivine est nécessaire pour la viabilité des cellules tumorales et promeut probablement la durée de vie de la Survivine. La phosphorylation de la Survivine peut être bloquée par plusieurs composés comme le flavopiridol, qui fonctionne comme antagoniste des kinases dépendantes du cyclin comprenant cdc2. Ces approches en combinaison avec la chimiothérapie et la radiothérapie paraîtraient très prometteuses.

5.7 Intérêt de la Survivine pour l'immunothérapie anti-cancéreuse

La surexpression dans les cellules tumorales et l'absence presque complète d'expression dans les tissus différenciés, ainsi que le rôle essentiel qu'elle exerce pour la survie des cellules tumorales font de la Survivine une cible intéressante pour le développement d'immunothérapie. Comme elle est intracellulaire, les immunothérapies envisagées reposent sur l'induction de lymphocytes T spécifiques de la Survivine.

En effet, des réponses immunes contre les épitopes dérivés de la Survivine ont été obtenues. En 2000, Schmitz et al. [Schultz et al., 2000] ont décrit deux épitopes restreints à la molécule HLA-A*0201 (aa 5-14 et 95-104) qui ont induit des réponses CTLs une fois présentés par les DCs autologues. Le peptide 95-104 contient un épitope naturellement présenté, car les cellules B EBV transfectées par l'ADNc de la Survivine sont lysées par des CTLs spécifiques de ce peptide. Le peptide 5-14 induit des CTLs spécifiques qui peuvent lyser des cellules tumorales exprimant la Survivine et la molécule HLA-A2 [Siegel et al., 2004]. La réponse T cytotoxique spontanée de la Survivine a été observée. Andersen et al. [Andersen et al., 2001a] ont en effet détecté les cellules T CD8+ spécifiques du peptide 95-104 et d'un peptide modifié (96-104) dans lequel la thréonine native à la position 2 a été remplacée par une méthionine, dans le sang de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique et de mélanome. Dans une étude complémentaire effectuée par la même équipe, des multimères du peptide 96-104 modifié et les molécules HLA-A2 ont été employées pour isoler des lymphocytes T CD8+ dans les ganglions drainant d'un mélanome. Ces cellules reconnaissent spécifiquement le peptide natif et les cellules tumorales exprimant la Survivine et les molécules HLA-A2 [Andersen et al., 2001b]. Un certain nombre d'épitopes T CD8+ restreints à HLA-A1, HLA-A2, à HLA-A3 et HLA-A11 ont été décrits par Reker et al basé sur des réponses CTLs spontanées de lymphocytes infiltrant les tumeurs [Reker et al., 2004]. Les positions et les séquences de ces peptides sont inclus dans Tab. 5.1 [Schmitz et al., 2005].

Des essais de vaccination utilisant des séquences de la Survivine ont été également effectués. Le peptide Survivine-2 β 80-88 restreint à la molécule HLA-A24 a été testé dans l'essai de phase I chez des patients atteints de cancer colorectal avancé [Tsuruma et al., 2004]. Dans cette étude, 15 patients ont reçu le peptide Survivine-2 β

| | | | |
|------------|-------------------------|-------------|------------------------|
| HLA-A*0201 | 95-104 | ELTLGEFLKL | Schmitz et al., 2000 |
| | | | Anderson et al., 2001a |
| | 5-14 | TLPPAWQPFL | Schmitz et al., 2000 |
| | | | Siegel et al., 2004 |
| | 96-104(2M) ^a | LLLGEFCLK | Anderson et al., 2001a |
| | | | Anderson et al., 2001b |
| HLA-A2 | 18-28 | RISTFKNWPFL | Reker et al., 2004 |
| HLA-A1 | 92-101 | QFEELTLGEF | Reker et al., 2004 |
| | 38-46(9Y) ^b | MAEAGFIHY | Reker et al., 2004 |
| | 93-101(2T) ^b | FTELTGEF | Reker et al., 2004 |
| | 47-56(10Y) ^b | PTENEPDLAY | Reker et al., 2004 |
| HLA-A3 | 18-27(10K) ^b | RISTFKNWPK | Reker et al., 2004 |
| HLA-A11 | 53-62 | DLAQCFFCFK | Reker et al., 2004 |

^a La thréonine natif à la position 2 a été changée par le résidu méthionine.

^b Par rapport à la séquence native de la Survivine, la cystéine a été substituée par la tyrosine à la position 9 dans le peptide 38-46, l'acide glutamique par la thréonine à la position 2 dans le peptide 93-101, la glutamine par la tyrosine à la position 10 dans le peptide 47-56 et phénylalanine par la lysine à la position 10 dans le peptide 18-27, respectivement.

TAB. 5.1: Les épitopes T CD8+ de la Survivine

dissout dans une solution saline physiologique sans aucun adjuvant afin d'évaluer strictement l'effet clinique de ce peptide. Une dose croissante de peptides a été testée et a montré que ce peptide n'est pas toxique et peut être injecté à plusieurs reprises à des patients sans effet secondaire important. Les résultats sont prometteurs : chez 6 patients, les niveaux de marqueur de tumeur (CEA et CA199) ont transitoirement diminué pendant la période de la vaccination. Onze patients ont toutefois vu leur tumeur progresser. L'analyse des lymphocytes circulants d'un patient par des tétramères HLA-A24/peptide a indiqué une augmentation de la fréquence de CTLs de 0.09% à 0.35% après 4 vaccinations. Plus récemment un vaccin ADN codant la Survivine et une chimiokine CCL21 a été testé sur des souris ayant les métastases de tumeur du poulmon. La coexpression de CCL21 peut efficacement attirer les DCs activées et les cellules T naïves, et peut les réunir dans les organes lymphoïdes secondaires pour une réponse cellulaire efficace. Ce vaccin a provoqué une activation sensible des DCs, et une réponse efficace de cellules T CD8+ contre la Survivine. Ceci a eu comme conséquence l'éradication ou la suppression de métastases pulmonaire de carcinome de poulmon cellules chez des souris C57BL/6J [Xiang et al., 2005].

La plupart des études de la réponse immune dirigée contre la Survivine ont porté sur la réponse cellulaire médiées par les lymphocytes T CD8+. En fait la réponse humorale induite par la Survivine a également été observée chez des patients atteints de cancers alors que cette réponse spontanée n'est pas observée chez les donneurs sains [Ichiki et al., 2005]. L'existence de cette réponse humorale indique qu'il y a aussi une activation de cellules T CD4+ chez les patients, qui ont fourni une aide nécessaire à l'apparition des anticorps. En effet, dans l'étude de Casati et al. 2003, les auteurs ont détecté à la fois une réponse de lymphocytes T CD8+ et de lymphocytes T CD4+ chez un même patient atteint de cancer colorectal [Casati et al., 2003]. Toutefois aucun épitope T CD4+ n'a été caractérisée. Pourtant, il parait clair que la l'activation de cellules T CD4+ effectrices contribue à l'éradication des tumeurs.

5.8 Notre objectif

L'objectif de cette étude est d'identifier des épitopes T CD4+ dérivés de la Survivine qui présentent un intérêt à la fois pour la préparation de vaccins anti-tumoraux mais aussi pour le suivi de la réponse immune dirigée contre la Survivine. Notre

stratégie s'appuie sur un protocole qui comprend trois étapes :

1. Identifier des peptides de la Survivine se liant avec une bonne affinité à plusieurs molécules HLA II par des tests de liaison ex vivo.
2. Evaluer l'immunogénicité potentielle des différents peptides par des tests d'induction de lymphocytes T CD4+ in vitro.
3. Ces lymphocytes T CD4+ spécifiques de peptides sont caractérisés par des tests de restriction, des tests de dose réponse et des tests de la reconnaissance d'antigènes natifs présentés par les cellules dendritique autologues.

5.9 Résultats

5.9.1 Tests de liaison des peptides de la Survivine aux molécules du HLA II (DP, DR)

27 peptides chevauchants de la Survivine ont été synthétisés selon la stratégie Fmoc, purifiés par chromatographie en phase liquide, et mis en solution. Chaque séquence peptidique retenue contient un résidu aliphatique ou aromatique dans sa partie N terminale qui est nécessaire à la fixation aux molécules HLA-DR et HLA-DP4. La qualité de chaque peptide est contrôlée par spectrométrie de masse.

Le principe du test de liaison est celui d'un test ELISA en compétition décrit dans Chapitre 4. Nous avons testé la capacité de liaison de peptides couvrant la séquence entière de la Survivine vis-à-vis de douze molécules HLA II. Ces dernières correspondent à 10 molécules HLA-DR : sept molécules codées par les gènes HLA-DRB1 (HLA-DRB1*0101, *0301, *0401, *0701, *1101, *1301, *1501), trois molécules codées par les gènes HLA-DRB3*0101, HLA-DRB4*0101, HLA-DRB5*0101 et deux molécules HLA-DP codées par les gènes HLA-DPB1*0401 et HLA-DPB1*0402. Les résultats sont exprimés sous forme d'IC₅₀. Le seuil d'activité pour discriminer les peptides actifs des peptides inactifs est toujours IC₅₀ inférieur à 1000 nM. Les résultats de tests de liaison de l'ensemble des 27 peptides de la Survivine aux molécules HLA-DR et HLA-DP sont présentés dans Tab. 5.2.

Trois régions distinctes de la protéine Survivine sont capables de se lier à plusieurs molécules HLA-DR et HLA-DP étudiées, à savoir : les régions N terminale 17-34, 84-

| peptides | DR1 | DR3 | DR4 | DR7 | DR11 | DR13 | DR15 | DRB3 | DRB4 | DRB5 | DP401 | DP402 |
|--------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| BIR5 1-15 | 10800 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 63 | >10 ⁵ | 80000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 8000 | 9200 | 6928 |
| BIR5 4-18 | 45000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 33 | 40000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 5477 | 8998 | 3594 |
| BIR5 8-22 | 6573 | 16000 | 46000 | 9391 | 41 | 2314 | 5200 | 8718 | 29000 | 2191 | 21000 | 10450 |
| BIR5 11-25 | 6000 | 65000 | 45000 | 8000 | 329 | 2408 | 22 | 3674 | 75000 | 2258 | 33000 | 25000 |
| BIR5 17-31 | 19 | >10 ⁵ | 9200 | 18 | 247 | 735 | 3 | >10 ⁵ | 7500 | 302 | 40 | 29 |
| BIR5 20-34 | 11 | >10 ⁵ | 5200 | 20000 | 210 | 2449 | 1304 | >10 ⁵ | 5500 | 6500 | 210 | 114 |
| BIR5 23-37 | 71 | >10 ⁵ | 5200 | 60000 | 37000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 3421 | >10 ⁵ | 3700 |
| BIR5 36-50 | 2550 | >10 ⁵ | 17000 | 17000 | 5586 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 49000 | 3795 | 3622 | 3169 |
| BIR5 41-55 | 2315 | >10 ⁵ | 5000 | 3735 | 1148 | >10 ⁵ | 7000 | 10 ⁴ | 328 | 3382 | >10 ⁵ | >10 ⁵ |
| BIR5 52-66 | 4100 | 11832 | 22000 | 6673 | 92 | 23000 | 2245 | 12649 | >10 ⁵ | 5348 | >10 ⁵ | 4583 |
| BIR5 56-70 | 1597 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 13000 | 363 | >10 ⁵ | 3000 | 12000 | >10 ⁵ | 20000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ |
| BIR5 59-73 | 3759 | >10 ⁵ | 58000 | 9000 | 1844 | >10 ⁵ | 8000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 45000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ |
| BIR5 62-76 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 65000 | 29000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ |
| BIR5 65-79 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ |
| BIR5 72-86 | 95000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 11000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 6200 | >10 ⁵ | >10 ⁵ |
| BIR5 84-98 | 2828 | 2569 | 19000 | 179 | 10 | 846 | 574 | 11832 | 1327 | 1766 | 167 | 113 |
| BIR5 87-101 | 150 | >10 ⁵ | 6450 | 705 | 2062 | >10 ⁵ | 4796 | 6797 | 9798 | 6000 | 3666 | 6387 |
| BIR5 90-104 | 40 | >10 ⁵ | 748 | 140 | 2349 | >10 ⁵ | 7500 | 48000 | >10 ⁵ | 280 | 48 | 19 |
| BIR5 91-105 | 12 | >10 ⁵ | 1587 | 56 | 2353 | >10 ⁵ | 3162 | 30000 | >10 ⁵ | 145 | 11 | 12 |
| BIR5 93-107 | 128 | >10 ⁵ | 5500 | 2793 | 548 | 7800 | 612 | 45000 | >10 ⁵ | 529 | 20 | 67 |
| BIR5 94-108 | ins. ^a | ins. | ins. | ins. | ins. | ins. | ins. | ins. | ins. | ins. | ins. | ins. |
| BIR5 96-110 | 18 | 5477 | 1666 | 5639 | 7 | 302 | 490 | >10 ⁵ | 3600 | 103 | 2915 | 620 |
| BIR5 99-113 | 48 | 4673 | 2134 | 6462 | 40 | 9165 | 1200 | >10 ⁵ | 22000 | 22 | 40000 | >10 ⁵ |
| BIR5 102-116 | 7746 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 50000 | 8944 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 18 | >10 ⁵ | >10 ⁵ |
| BIR5 111-125 | 5000 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 30000 | 70000 | 90000 | >10 ⁵ | 70000 | 16 | >10 ⁵ | >10 ⁵ |
| BIR5 122-136 | 5657 | 5809 | >10 ⁵ | 20000 | 310 | 995 | 1200 | >10 ⁵ | >10 ⁵ | 447 | >10 ⁵ | >10 ⁵ |
| BIR5 128-142 | 6 | 12000 | 352 | 1342 | 25 | >10 ⁵ | 284 | >10 ⁵ | 1803 | 1090 | 13000 | 20000 |

Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en nM et correspondent à la valeur moyenne d'au moins deux expériences indépendantes.

La spécificité de chaque test est estimée sur les valeurs d'IC₅₀ des peptides de référence, qui ne doivent pas varier de plus d'un facteur 3 (Données non présentées). Les IC₅₀ inférieurs à 1000 nM sont indiqués en rouge.

^a ins.=insoluble

TAB. 5.2: Capacité de liaison des peptides de la Survivine aux molécules HLA-DR et HLA-DP

110 et C terminale 122-142. Les peptides issus du reste de la séquence ne présentent pas d'activité de liaison significative pour au moins trois molécules HLA II sur douze étudiées. On n'a trouvé aucun peptide de la Survivine capable de se lier aux molécules DR3, DRB3 et DRB4. Dans la région N terminale de la protéine, les peptides 17-31 et 20-34 présentent les valeurs d'IC₅₀ les plus faibles. Ils ont une bonne affinité pour les molécules HLA-DRB1*0101, *0701, *1301, *1501, HLA-DRB5*0101, HLA-DP*0401, HLA-DP*0402 (Tab. 5.2). Dans la région 84-110, les capacités de liaison des quatre peptides chevauchants 84-98, 90-104, 93-107, 96-110 couvrent une grande partie des molécules HLA-DR (HLA-DRB1*0101, *0401, *0701, *1101, *1301, *1501, HLA-DRB5, HLA-DP*0401, *0402) (Tab. 5.2). Le peptide 91-105 présente de bonnes affinités pour les molécules HLA-DRB1*0101, *0701, DRB5*0101, DPB1*0401, *0402. Dans la région C terminale, le peptide 128-142 se lie avec une bonne affinité aux molécules HLA-DRB1*0101 et *1101, et avec une moindre affinité aux molécules HLA-DRB1*0401 et *1501 (Tab. 5.2).

Les tests de liaison présentés ont permis de sélectionner sept peptides de bonne affinité pour plusieurs molécules HLA-DR. Ce sont les peptides 17-31, 20-34, 84-98, 90-104, 93-107, 96-110, 128-142. Ces peptides ont été ensuite étudiés pour leur immunogénicité, c'est-à-dire leur capacité d'induire une réponse T CD4+.

5.9.2 Génération de lignées de lymphocytes T CD4+ contre les peptides de la Survivine

La capacité des peptides de la Survivine sélectionnés à induire des lignées cellulaires T CD4+ spécifiques de ces peptides a été étudiée sur 7 donneurs sains. Le principe de la technique est décrit dans la partie MAGE-A. Les cellules T CD4+ isolées de 7 donneurs sains sont stimulées par les cellules dendritiques matures autologues préalablement incubées avec le mélange des 7 peptides sélectionnés. Après 3 stimulations, on a recherché les lignées de lymphocytes T CD4+ spécifiques des peptides de la Survivine par ELISpot IFN- γ en utilisant des PBMC autologues comme cellules présentatrices chargées du mélange des peptides et des peptides individuels et des PBMC autologues non chargées comme contrôles négatifs. Un bilan de lignées T CD4+ induites par peptide par donneur est exposé dans le Tab. 5.3. Les 7 donneurs étudiés présentent un typage HLA très différent, dont l'ensemble couvre une grande

| Donors | Typage HLA II | 17-31 | 20-34 | 84-98 | 90-104 | 93-107 | 96-110 | 128-142 |
|--------|------------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|
| P169 | DR1502, DP0402 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 12 | 0 |
| P171 | DR 0101, DR0401, DRB4, DP0401 | 2 | 1 | 3 | 3 | 0 | 0 | 7 |
| P174 | DR0701, DR1501, DRB4, DRB5, DP0401 | 10 | 0 | 0 | 3 | 2 | 1 | 1 |
| P179 | DR0701, DR1301, DRB4, DRB3 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 2 | 4 |
| P187 | DR0701, DR0401, DRB4 | 4 | 6 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| P188 | DR1101, DRB3, DP0401 | 1 | 2 | 3 | 7 | 3 | 1 | 0 |
| P180 | DR1, DR11, DP401 | 0 | 0 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| | Total | 18 | 9 | 11 | 19 | 8 | 19 | 14 |
| | Donors | 5 | 3 | 4 | 7 | 4 | 6 | 5 |

TAB. 5.3: Nombre de lignées spécifiques de peptides de la Survivine par individu

partie des allèles HLA II les plus représentés. Chaque peptide a pu induire des lignées de lymphocytes T, par exemple : les peptides 90-104 et 96-110 ont induit 19 lignées, et le peptide 17-31 a induit 18 lignées. Les autres peptides induisent entre 8 et 14 lignées différentes. D'après ces résultats, nous pouvons constater que tous les peptides sélectionnés sont immunogènes, ils sont tous capable d'induire une réponse T CD4+.

5.9.3 Caractérisations de lignées de lymphocytes T CD4+ induites par les peptides

Après le premier criblage, nous avons obtenu des lignées de lymphocytes T CD4+ spécifiques des 7 peptides de la Survivine. De manière à mieux caractériser les spécificités des différentes lignées obtenues par ces peptides, nous avons caractérisé pour une partie des lignées de lymphocytes T leur restriction, leur efficacité de reconnaissance des peptides et leur capacité à reconnaître l'antigène natif présenté par les cellules dendridiques immatures autologues.

5.9.3.1 Mise en évidence de l'élément de restriction et étude de la dose réponse

Pour savoir laquelle molécule responsable de la présentation de peptides, un test de restriction a été fait pour une partie de lignées T induites par les peptides. Nous possédons des lignées cellulaires de souris qui n'expriment pas les molécules HLA II. Elles sont transfectées avec un gène codant pour une molécule du HLA-DR ou HLA-DP4. C'est à dire que chaque lignée n'exprime qu'une molécule de HLA II. En l'occurrence, nous avons utilisé des lignées de cellules L-HLA II en accord avec le génotype des donneurs à tester. Ensuite nous avons chargé les différentes lignées de cellules L-HLA II avec chaque peptide étudié et utilisé ces lignées chargées de peptides pour stimuler les lignées LT obtenues. La production d'IFN- γ a été évaluée avec différentes cellules L-HLA II de manière à identifier la molécule présentatrice. Les résultats de ce test sont présentés dans la fig. 5.3.

12 lignées ont été testées. Elles proviennent de 6 donneurs. 3 lignées induites par le peptide 17-31 ont été testées (P174.31, P187.34, P187.23) : P174.31 a montré que le peptide 17-31 peut être présenté par HLA-DR7, DR15, DRB4 et DP4. Par contre, pour les lignées P187.34 et P187.23 le peptide 17-31 est présenté par HLA-DR4 et HLA-DR7. Le peptide 20-34 peut être présenté par HLA-DR11 à la lignée P188.52. Les lignées induites par le peptide 90-104 ont montré que ce peptide peut être présenté par HLA-DP4, DR7, DR11, et DRB5 aux différentes lignées T (P174.45, P174.25, P171.3, P169.25, P188.18, P208.15). Le peptide 93-107 et le peptide 90-104 sont présentés par HLA-DP4 à la même lignée P171.3. La lignée P187.34 a montré que le peptide 96-110 peut être présenté par HLA-DR4. Enfin sur la lignée P174.50 le peptide P128-142 est présenté par HLA-DR15. D'après ces résultats, nous pouvons constater que les zones 17-31 et 90-104 sont deux zones ayant une large spécificité pour les molécules HLA II. Ceci peut expliquer pourquoi les deux peptides ont induit le plus grand nombre de lignées de lymphocytes T par rapport aux autres peptides (Tab. 5.3). Par contre ceci n'exclut pas que les autres peptides puissent être des peptides ayant également une large spécificité, car nous avons seulement caractérisé une partie des lignées de lymphocytes T.

Nous avons aussi étudié quelques peptides pour leur capacité à stimuler les lignées de lymphocytes T (Fig 5.4). Par exemple, la lignée P174.45 est capable de reconnaître

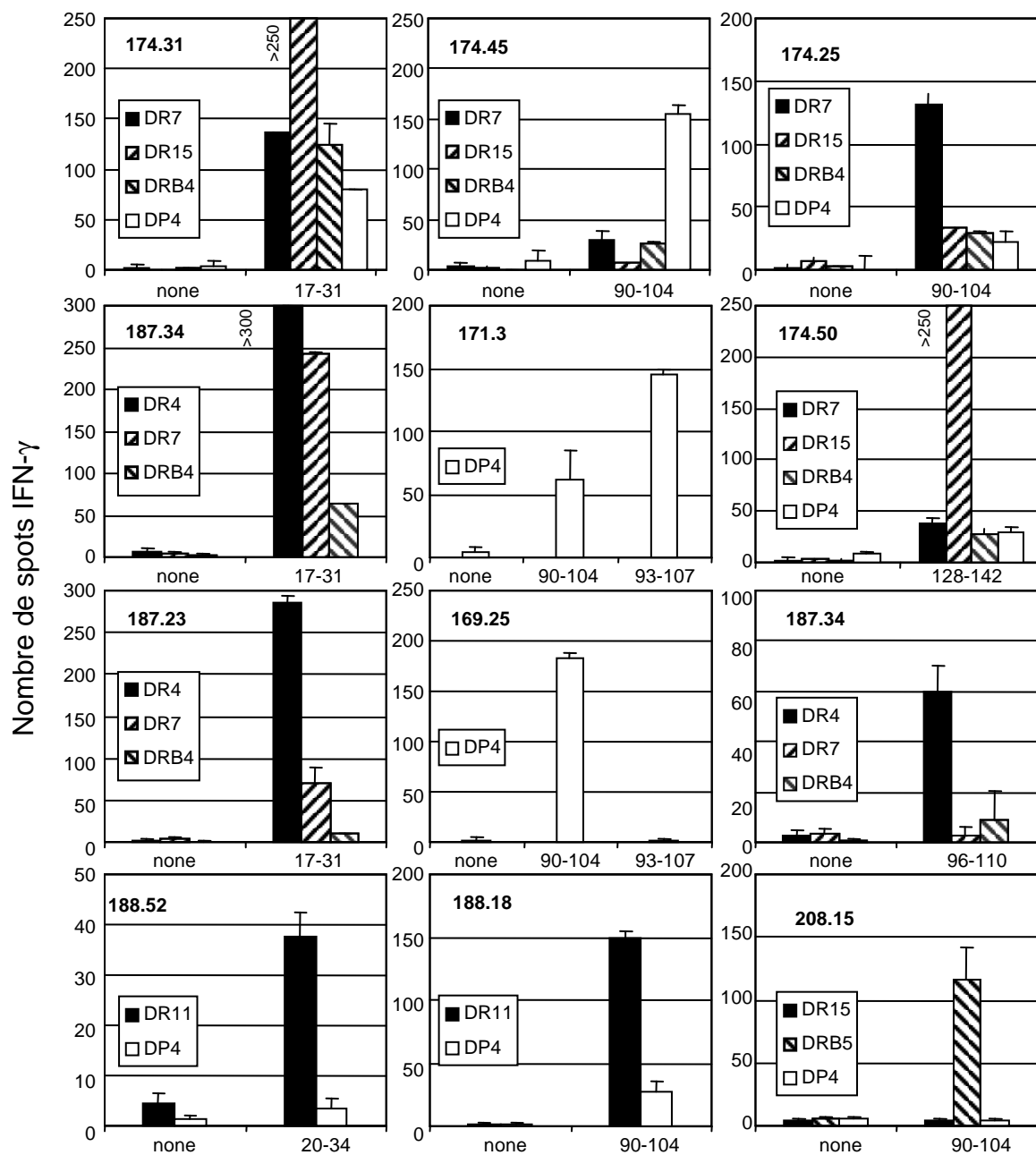


FIG. 5.3: Tests de restriction

12 lignées ont été testées : 3 lignées induites par le peptide 17-31 (P174.31, P187.34, P187.23) ; une lignée induite par le peptide 20-34 (P188.52) ; 6 lignées induites par le peptide 90-104 (P174.45, P174.25, P171.3, P169.25, P188.18, P208.15) ; une lignée induite par le peptide 96-110 (P187.34) ; et une lignée induite par le peptide 128-142 (P174.50). 5000 LT CD4⁺ ont été incubées avec les cellules L (30000/puits) qui expriment de différentes molécules de HLA-II en présence de peptide (10 μ g/ml) correspondant puis testés en Elispot IFN- γ . Les résultats sont exprimés sous forme du nombre de spots IFN- γ sécrétés comptés sur lecteur AID.

spécifiquement ces trois peptides 90-104, 93-107, 96-110 à des concentrations minimales de $10^{-0,5}$ à $10^{-1} \mu\text{g/ml}$, ce qui correspond sensiblement à des concentrations de $10^{-7} M$ à $10^{-6} M$. La lignée P174.50 est capable de reconnaître spécifiquement le peptide 128-142 à $10^{-2} \mu\text{g/ml}$, ce qui correspond sensiblement à $10^{-6} M$.

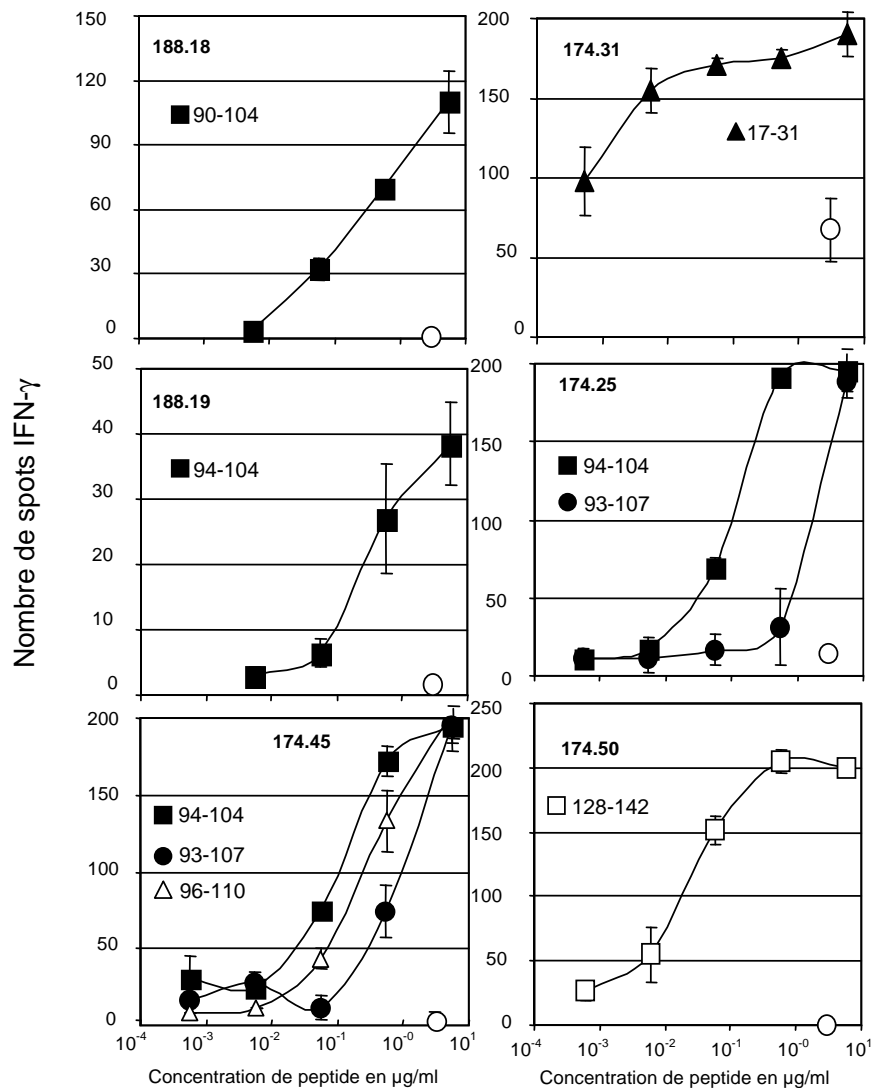


FIG. 5.4: Tests de dose réponse

5000 LT CD4+ ont été incubées en présence de PBMC autologues (30000/puis) et des concentrations variables de peptides ou sans peptide (cercle vide) puis testés en Elispot IFN- γ . Les résultats sont exprimés sous forme du nombre de spots IFN- γ sécrétés comptés sur lecteur AID.

5.9.3.2 Reconnaissance de l'antigène natif

Nous avons analysé 4 lignées de lymphocytes T CD4⁺ pour leur capacité à reconnaître l'antigène natif présenté par les cellules dendritiques immatures autologues. Cette étape est essentielle pour savoir si les peptides mis en évidence contiennent des épitopes qui sont naturellement apprêtés et présentés sur les molécules HLA II à la surface des APC. Ce test consiste à charger les cellules dendritiques immatures autologues avec l'antigène natif, c-à-d la Survivine, pour stimuler les lignées de lymphocytes T induites par les peptides. La production d'IFN- γ a été évaluée pour chacune de ces 4 lignées de lymphocytes T. Les résultats sont présentés dans la Fig. 5.5. Parmi ces 4 lignées, deux provenant du donneur P187, deux autres provenant du donneur P188. Les deux lignées de lymphocytes T de P187 sont spécifiques de deux peptides (P17-31 et P20-34). Les deux lignées de lymphocytes T de P188 sont spécifiques de P90-104, P90-104 et P93-107 respectivement. Ces 4 lignées de lymphocytes T ont reconnu la Survivine présentée par les cellules dendritiques immatures autologues, mais pas la protéine Nef utilisé comme un contrôle négatif. Avec ce test, on peut dire que les peptides 17-31, 20-34, 90-104, et 93-107 comprennent des épitopes naturellement produits lors de la présentation de l'antigène natif.

5.9.4 Discussion

La Survivine est une protéine surexprimée dans les tumeurs. Elle est en revanche pratiquement indétectable dans les tissus différenciés sains. Elle est impliquée dans la division cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. Sa perte d'expression par échappement pourrait freiner la progression de la tumeur. Elle apparaît donc comme une cible privilégiée pour l'immunothérapie antitumorale. C'est pourquoi nous avons entrepris d'identifier des épitopes TCD4⁺ de la Survivine présentés par différentes molécules HLA II, épitopes qui n'ont pas encore été décrits à ce jour.

Dans ce but, nous avons utilisé une stratégie basée sur :

1. La sélection des peptides de la Survivine les plus affins pour 12 molécules HLA II différentes grâce à l'utilisation de tests de liaison spécifique.
2. L'évaluation in vitro de la stimulation par ces peptides de lignées T CD4⁺ spécifiques purifiés à partir de PBMC de différents donneurs.
3. La caractérisation de lignées T CD4⁺ induites par les peptides.

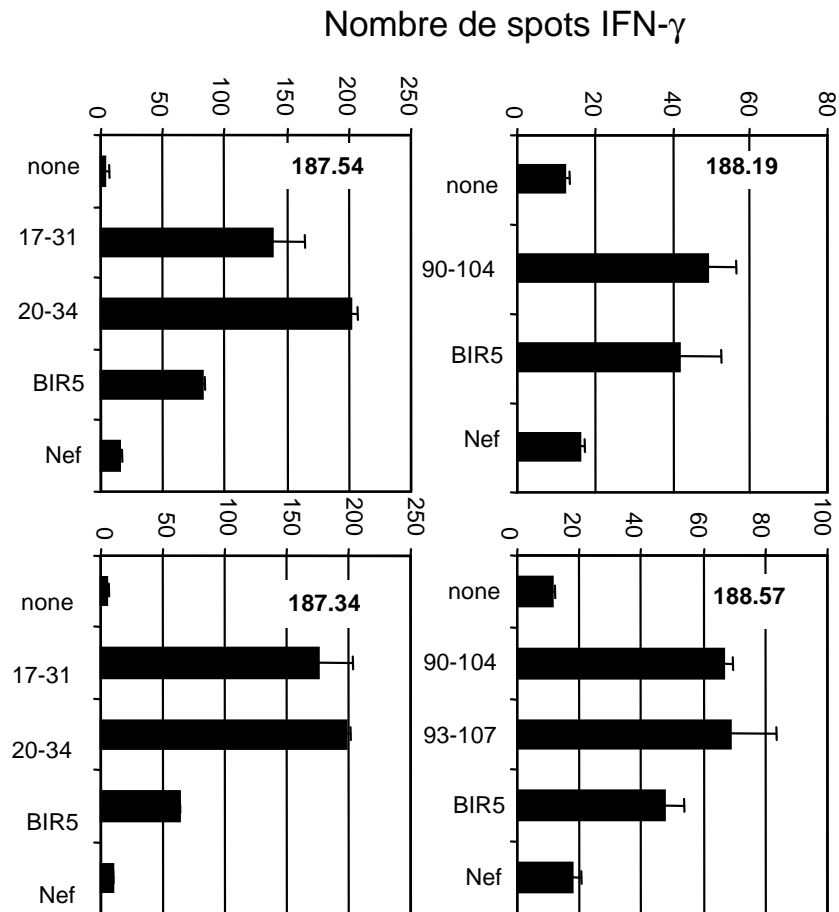


FIG. 5.5: Reconnaissance de l'antigène natif

4 lignées spécifiques des peptides 17-31, 20-34, 90-104, 93-107 ont été testés. 5000 LT CD4⁺ ont été incubées en présence de DCs immatures autologues (20000/puis) chargées de la protéine native puis testés en Elispot IFN- γ . Les résultats sont exprimés sous forme du nombre de spots IFN- γ sécrétés comptés sur lecteur AID.

Grâce aux tests de liaison, nous avons identifié trois régions de la Survivine capable de se fixer avec une bonne affinité aux molécules HLA II étudiées à savoir les régions N terminale 17-34, centrale 84-110 et C terminale 128-142. ($IC_{50} < 1000nM$). Sept peptides couvrant ces régions (17-31, 20-34, 84-98, 90-104, 93-107, 96-110, 128-142) ont été sélectionnés pour évaluer leur immunogénicité *in vitro*. Ces 7 peptides peuvent se lier avec une bonne affinité à plusieurs molécules HLA-DR et DP. Ces molécules HLA II sont prépondérantes en Europe et aux Etats-Unis et couvrent l'ensemble de la population.

Dans les expériences *in vitro*, nous avons démontré l'immunogénicité des peptides sélectionnés. Selon le typage HLA II de chaque donneur, le peptide le plus immunogène varie. Chez le donneur 174 de génotype HLA-DR1501, DR7, DRB4, DRB5, DP4 le peptide 17-31 est le plus immunogène. En revanche chez le donneur 169 de génotype DR1502, DP401 le peptide 96-110 est le plus immunogène. Chez l'individu 179 la réponse T CD4+ est dirigée vers plusieurs peptides de Survivine 17-31, 84-98, 90-104, 96-110, 128-142. A partir de cette étude effectuée sur 7 donneurs ayant des haplotypes différents, on a observé que tous les peptides sont immunogènes et qu'en particulier, les peptides 17-31, 90-104, 96-110, 128-142 ont induit les plus nombreuses de lignées T.

Les études de restriction montrent qu'un même peptide peut être présenté par plusieurs molécules HLA II chez un même individu et stimuler des lymphocytes T CD4+ spécifiques. Par exemple, le peptide 17-31 qui est le peptide le plus immunogène chez le donneur 174, est reconnu spécifiquement par la lignée P174.31 quand il est présenté par la molécule DR15. Cependant on observe également une réponse T CD4+ lorsque le peptide est présenté par les molécules DRB5, DR7, DRB4. (Fig. 5.3) Un autre exemple est le peptide 90-104 qui est présenté par la molécule HLA-DP4 sur la lignée P174.45, alors que il est présenté à la lignée P174.25 par la molécule HLA-DR7(Fig. 5.3).

Les épitopes T CD4+ capables d'induire une réponse immune spécifique semblent être présentés par les molécules HLA II pour lesquelles ils ont le plus d'affinités. Les données de restriction ont prouvé que le peptide 17-31 peut être présenté par HLA-DR7, DR15,et DP4, et que les épitopes de la région 90-110 sont présentés par HLA-DR7, DRB5, et DP4. Les tests de liaison aux molécules HLA II (Tab. 5.2) montrent que le peptides 17-31 est plus affins pour les molécules HLA-DR7, DR15,et

DP4($IC_{50} < 50$) comparativement aux autres molécules. Les peptides 90-104 et 93-107 ont également une bonne affinité pour les molécules HLA-DR7, DRB5, et DP4. Ces observations sont en accord avec celles effectuées par d'autres. Plusieurs études ont en effet suggéré une relation entre bonne affinité pour HLA II et l'immunogénicité [Zarour et al., 2002, Mandic et al., 2005]. En revanche, il y a aussi quelques contre exemples : dans les tests de liaison au HLA II *in vitro* (Tab. 5.2) le peptide 17-31 n'a pas montré une forte affinité pour HLA-DR4, et DRB4($IC_{50}=4290, 8216$ respectivement). Cependant il est bien présenté par ces deux molécules dans les tests de restriction (Fig. 5.3). C'est aussi le cas du peptide 96-110 avec HLA-DR4. Nous savons depuis longtemps que le motif de liaison des molécules HLA II dépend de 5 poches importantes P1, P4, P6, P7, P9. Les autres résidus ayant peu d'influence sur l'affinité vis-à-vis des molécules HLA II. En revanche, la reconnaissance par le Tcr fait intervenir des résidus exposés (tels que P5, P3 et P8) ainsi que des résidus en dehors de la région responsable de la fixation sur les molécules HLA II (P-1 et P11) [Arnold et al., 2002]. Il est donc possible qu'une médiocre capacité de liaison aux des molécules HLA II soit compensée par une forte affinité du Tcr pour le complexe "molécule HLA/peptide".

D'après les tests de dose réponse, nous pouvons constater que des peptides sont efficaces pour induire des lignées de lymphocytes T CD4+. Par exemple, les peptides 90-104 et 128-142 stimulent les LT CD4+ à une concentration très faible ($10^{-7}M, 10^{-6}M$ respectivement). Les résultats sont encore préliminaires mais, dans cet exemple, on montre que les peptides mis en évidence sont antigéniques et que l'on peut obtenir des lignées pouvant être stimulées à de faibles concentrations de peptides. Dans une étude dirigée par celis E. [Kobayashi et al., 2000], les auteurs ont rapportées que les LT CD4+ spécifiques de l'antigène HER2/neu, antigène du soi surexprimé dans les tumeurs et exprimé dans les tissus normaux y compris dans le thymus, ne sont stimulées qu'à de très fortes concentrations de peptides. La Survivine étant une protéine du Soi, on aurait pu s'attendre à ce que nos peptides n'induisent pas de réponse immunitaire ou une réponse T de très faible avidité du fait de la tolérance périphérique.

Comme nous sommes toujours limités par le nombre de cellules T, nous n'avons pu tester que 4 lignées T pour la reconnaissance de l'antigène natif. Ces tests ont montré que les peptides 17-31, 20-34, 90-104 et 93-107 sont des épitopes naturellement apprêtés lors de la présentation de la Survivine.

Faute de temps, nous n'avons pas pu étudier la capacité des cellules T CD4+ à reconnaître les cellules tumorales de façon directe ou le lysat de cellules tumorales présenté par des cellules dendritiques. Ces travaux sont en cours de réalisation au laboratoire.

Dans la perspective d'une utilisation clinique, les épitopes T CD4+ de la Survivine identifiés se lient à aux allèles HLA II les plus représentés de la population Européenne et Nord Américaine. Récemment des épitopes de la Survivine restreints au HLA-A2, A1, A3, A11, A24 et B35 ont été identifiés à la surface de différentes cellules tumorales [Ichiki et al., 2005]. L'induction d'une réponse cytotoxique et son maintien à long terme étant dépendante de l'activation des lymphocytes T CD4+, la mise en évidence d'épitopes TCD4+ semble utile. De plus, il a été démontré que la présence d'une réponse Th1 permet une augmentation de la fréquence et de l'avidité des LT cytotoxiques induits par vaccination peptidique [Romieu et al., 1998]. Ainsi les résultats obtenus peuvent avoir des perspectives d'utilisation dans l'avenir en diagnostic et en thérapeutique. Un taux élevé d'anticorps dirigés contre la Survivine est retrouvé chez des patients atteints de cancer de mauvais pronostic, pas chez les individus sains [Altieri, 2001, Rohayem et al., 2000]. Il est attendu que cette réponse humorale soit dépendante de lymphocytes T CD4+ spécifiques de la Survivine. Les peptides que nous avons identifiés devraient pouvoir détecter ces lymphocytes T CD4+. Il sera également intéressant d'évaluer la précocité de la réponse cellulaire par rapport à la réponse humorale. Les peptides mis en évidence pourront également servir au suivi immunologique de patients après vaccination antitumorale. Ils seraient utiles pour suivre la réponse immunitaire après vaccination que ce soit un vaccin ADN, protéique, etc.

Les peptides pourront être utilisés dans le cadre de vaccination peptidique ou de vaccination par des cellules dendritiques préalablement incubées avec les peptides. Aujourd'hui les principales études de vaccination antitumorale sont basées sur l'induction d'une réponse LT cytotoxique. L'utilisation d'épitopes T CD4+ et CD8+ capables d'être présentés par plusieurs molécules HLA est une manière d'améliorer le pouvoir immunogène des préparations vaccinales et permet d'inclure une population plus large dans les essais cliniques sur la vaccination peptidique. Il est intéressant de constater que les peptides 90-104 à 96-110 chevauchent un épitope CD8+ de la Survivine (96-104) qui a été récemment été utilisé dans un essai de vaccination [Otto

et al., 2005].

Ainsi les séquences peptidiques qui ont été mises en évidence dans cette étude présentent un intérêt à la fois diagnostique et vaccinal.

Chapitre 6

Prédiction d'épitopes T CD4+ restreints au HLA-DP4

6.1 Approches algorithmique utilisées dans la prédiction d'épitopes T CD4+

Pour identifier les épitopes T CD4+ dérivés d'antigènes tumoraux, les approches basées sur la synthèse et l'analyse des peptides chevauchants de l'antigène d'intérêt, ne sont pas applicables à des grandes séquences protéiques. Cependant, des approches algorithmiques capables de simuler et de prédire le processus biologique de la présentation d'antigène peuvent être appliquées pour réduire au maximum le nombre de peptides à synthétiser et à tester. Plusieurs approches algorithmiques ont été traditionnellement employées pour la prédiction d'épitopes T CD4+ :

Approche basée sur le motif de fixation Les motifs de liaison sont définis par l'ensemble des acides aminés qui favorisent la liaison aux molécules HLA II. Ils indiquent quelles positions et quels acides aminés sont importants pour la liaison. Cependant, les modèles de prédiction basés sur les motifs de liaison ont souvent des taux de faux négatifs très élevés [Bian et al., 2003].

Approche basée sur les réseaux neuronaux ANN (artificial neural network) Les ANNs sont des méthodes d'apprentissage. La large majorité des ANNs possède un algorithme « d'entraînement » qui permet aux ANNs « d'apprendre » à partir

des exemples soumis et de mémoriser des profils de données. Le réseau est capable de reconnaître plus tard ces mêmes profils pour les nouvelles entrées. Les approches basées sur ANNs se sont avérées très efficaces pour la prédiction des épitopes de HLA-II (DRB1*0401). Cependant, ils sont limités par la nécessité de posséder de grandes quantités de données d'entraînement [Brusic et al., 1998]. En outre, la prédiction de peptides promiscuitaires peut être erronée puisque des données acquises pour un allèle ne peuvent pas être généralisées à d'autres allèles.

Approches basée sur les matrices quantitatives Les matrices quantitatives peuvent être établies à partir de la contribution quantitative de chaque acide aminé à chaque poche spécifique [Bian et al., 2003]. Les prédictions basées sur les matrices quantitatives ont supposé que les effets des poches sont indépendants. Leur exactitude prédictive est considérable, mais leur précision et fiabilité sont limitées par le fait qu'ils ignorent la dépendance entre les poches dans la prédiction. Comme les ANNs, ils ont besoin d'une grande quantité de données pour couvrir des complexes peptide/HLA-II et pour chaque allèle de HLA-II. Un exemple de ce type d'approche est le logiciel TEPITOPE présenté dans Chapitre 3.

De nombreux épitopes T CD4+ ont été identifiés par les matrices quantitatives, ce qui démontre l'efficacité de ces approches [Southwood et al., 1998, de Lalla et al., 1999, Manici et al., 1999, Sturniolo et al., 1999, Cochlovius et al., 2000, Wilson et al., 2001]. Cependant, les matrices quantitatives employées actuellement pour la prédiction d'épitope ont été créées sur la base des études de l'interaction de peptide/HLA-DR. Pour les molécules HLA-DQ, il est difficile de créer des matrices en raison de l'interdépendance des résidus d'ancrage [Raddrizzani et al., 1997]. La prédiction des épitopes restreints au HLA-DP n'a jamais été rapportée, bien que multiples épitopes de HLA-DP aient été décrits dans différents antigènes [Wyss-Coray et al., 1992, Schultz et al., 2000, Zeng et al., 2001, Castelli et al., 2002, de Graaff et al., 2004, Mandic et al., 2005]. En effet, il y a très peu de données publiées sur la liaison à HLA-DP [Dong et al., 1995, Chiczy et al., 1997, Castelli et al., 2002, Berretta et al., 2003].

Compte tenu de la fréquence des molécules HLA-DP4 au sein des différentes populations mondiales, il nous a paru intéressant de mettre en place un programme de prédiction des peptides sur HLA-DP4. Nous avons choisi de baser cette prédiction sur des matrices quantitatives utilisant des données de liaison déjà obtenues [Castelli

et al., 2002] et d'autres données que nous avons générées.

6.2 Présentation de l'article

Matrice de prédiction pour les peptides se fixant à HLA-DP4 Le principe de matrice de prédiction repose sur la contribution dans la fixation du peptide de chaque acide aminé localisé dans chacune des poches. Dans un travail antérieur du laboratoire, Castelli et al. ont choisi le peptide Oxy 271-287 comme référence pour établir les conditions de liaison aux molécules HLA-DP4. Il s'agit d'un peptide naturellement présenté et élué de la molécule HLA-DP401. Au moyen de peptides Oxy 271-287 monosubstitués, 4 poches spécifiques importantes (P1, P4, P6 et P9) pour la liaison avec HLA-DP4 ont été mises en évidence. Les acides aminés favorables et non favorables pour la liaison dans chaque poche ont été caractérisés [Castelli et al., 2002]. Pour définir la matrice de prédiction, nous avons d'abord complété les données de liaison de Castelli et al et généré la plupart des peptides monosubstitués possibles de ces quatre poches spécifiques. Nous avons ensuite quantifié l'activité relative (RA), c'est à dire le ratio entre les IC_{50} du peptide Oxy 271-287 monosubstitué et celui du peptide natif :

$$RA_{i,j} := \frac{IC_{50}(\text{Oxy 271-287 monosubstitué par le } j\text{-ième acide aminé dans la } i\text{-ième poche})}{IC_{50}(\text{Oxy 271-287 natif})}$$

Ainsi, $[RA_{i,j}]$ constitue une matrice. Nos données complémentaires avec les valeurs RA sont présentées dans la Tab. I dans l'article. Un plus grand $RA_{i,j}$ implique une perte de liaison plus importante due au remplacement par le j -ième acide aminé dans la i -ième poche. En accord avec les anciennes données de Castelli, nous avons confirmé que les résidus aliphatique et aromatique dans les poches P1 et P6 jouent un rôle important dans la liaison à HLA-DP4 (voir les grandes valeurs de $RA_{1,}$ et $RA_{6,}$ dans Tab. I). Nous montrons dans Tab. II la matrice de prédiction $[PM_{i,j}]$ définie par :

$$PM_{i,j} := \log(RA_{i,j})$$

Dans la Tab. II de l'article, les valeurs en gris léger proviennent des données de Castelli et al., les valeurs en gris foncé sont obtenues par notre étude, et celles en fond blanc sont obtenues par estimation.

Fiabilité pertinence de la prédiction des peptides restreints au HLA-DP4

Nous avons testé 98 peptides pour évaluer la matrice de prédiction. Ces 98 peptides incluent 30 peptides chevauchants couvrant toute la séquence de venin d'abeille, 52 peptides issus des protéines Core et NS3 de HCV et 6 peptides de la protéine Nef d'HIV. Nous avons également inclus les peptides qui ont été précédemment décrits en tant qu'épitopes présentés par HLA-DP4 [Castelli et al., 2002]. Dans notre étude, tous les peptides ont été à la fois testés par le test de liaison spécifique de HLA-DP4 et par la prédiction de liaison. Dans les tests de liaison, les « ligands » sont définis comme les peptides dont l' IC_{50} ne dépasse pas $T_b := 1000nM$, tandis que les « bons ligands » sont ceux dont IC_{50} ne dépasse $T_{gb} := 100nM$. Avec ces critères, 17 et 21 peptides étaient « ligands » respectivement pour HLA-DP401 et HLA-DP402 (Tab. III de l'article). De plus, 14 peptides sont « ligands » à ces deux molécules.

Ensuite, pour évaluer la performance de prédiction, nous avons étudié la corrélation entre les IC_{50} réelles et les IC_{50} prédites. Les IC_{50} prédites pourraient théoriquement varier de $10nM$ à $10^{10}nM$, tandis que les données expérimentales sont limitées à 10^4nM ou 10^5nM . La corrélation entre les IC_{50} prédites et IC_{50} réelles est présentée dans Figure 1 de l'article. Les peptides sont séparés en 4 différents quadrants (FN : faux négatifs ; TN : vrais négatifs ; TP : vrais positifs et FP : faux positifs). La prédiction utilise les seuils \tilde{T}_b et \tilde{T}_{gb} pour décider respectivement si un peptide est « ligand » ou « bons ligands ». Prenons la prédiction de « ligands » comme exemple, un seuil de prédiction fixé à $\tilde{T}_b = T_b = 1000nM$ identifie 31 peptides (TP+FP) dans la famille des « ligands » à la molécule HLA-DP401. Parmi ces 31 peptides, 15 peptides sont réellement « ligands » (TP) d'après les tests de liaison (Tab III). De plus, les FN contiennent seulement 2 peptides. Ainsi, la corrélation entre les IC_{50} réelles et celles prédites est significative. De même, un tiers de peptides prédits positifs (avec $\tilde{T}_b = T_b$) sont réellement « ligands » au HLA-DP402.

Pour trouver les seuils optimaux de prédiction (\tilde{T}_b et \tilde{T}_{gb}), nous avons étudié leur efficacité statistique de prédiction. Pour cela, nous définissons trois quantités statistiques :

1. Valeur de prédiction positive (PPV)

$$PPV := \frac{\#TP}{\#TP + \#FP}$$

2. Sensibilité (SEN)

$$\text{SEN} := \frac{\#TP}{\#TP + \#FN}$$

3. Spécificité (SPE)

$$\text{SPE} := \frac{\#TN}{\#TN + \#FP}$$

où on utilise $\#A$ pour dénoter le cardinal d'un ensemble A . Pour la prédiction des « ligands », notre seuil \tilde{T}_b varie entre $100nm$ et 10^5nm , et PPV, SEN et SPE sont calculées pour chaque valeur de \tilde{T}_b . Nous obtenons ainsi une suite d'échantillons de ces quantités représentées par des cercles vides dans Figure 2 de l'article. On procède de la même manière pour la prédiction des « bons ligands », et ces quantités sont représentées par des cercles noirs dans la même figure.

Dans la prédiction de « ligands » à la molécule HLA-DP401, on peut constater que la PPV s'élève à 100% (Fig. 2A) si le seuil de prédiction est fixé à 100nM. Pourtant, dans ce cas là la sensibilité n'est que de 35% (Fig. 2B). Autrement dit, tous les peptides prédits sont réellement des « ligands » mais ils couvrent seulement un tiers de l'ensemble de « ligands ». Un seuil plus élevé de 1000nM fait augmenter la sensibilité jusqu'à 88% (Fig. 2B), alors que la PPV diminue à 50% (Fig. 2A). Il existe donc un compromis entre PPV et SEN. La même conclusion peut être tirée en ce qui concerne la fixation à HLA-DP402.

La Figure 2 de l'article montre aussi que la prédiction de « bons ligands » est généralement moins efficace que la prédiction de « ligands », surtout pour HLA-DP402 où la PPV n'excède même pas 27% (Fig. 2D). Encore une fois, le compromis entre la PPV et la SEN est toujours visible.

De plus, on peut remarquer que dans tous les cas la spécificité est assez élevée et est toujours supérieure à 50% (Fig. 2C). Cela signifie que la plupart de « non ligands » et « non bons-ligands » sont correctement trouvés.

Finalement, on conclue que les seuils de prédictions peuvent être choisis entre 100nM and 1000nM pour identifier les ligands et les bons ligands.

Conclusion Dans cette étude, nous avons décrit une méthode de prédiction de peptide aux molécules HLA-DP4. De plus nous avons étudié l'influence de la sélection de seuil de prédiction sur l'efficacité de la prédiction. Les comparaisons des résultats de la prédiction et des données expérimentales montrent que notre méthode de prédiction

peut efficacement identifier les ligands de HLA-DP4 pour réduire considérablement le nombre de peptides à tester. Elle convient particulièrement aux grandes séquences protéiques. Ceci a été clairement montré par les résultats que nous avons obtenu sur le génome du HIV [Cohen et al., 2006](voir aussi Annexe 1 de l'article) et sur la famille MAGE-A (Chapitre 7).

Research paper

Prediction of CD4+ T cell epitopes restricted to HLA-DP4 molecules

Marc Busson^{b,*}, Florence A. Castelli^a, Xiao-Fei Wang^a, William M. Cohen^a,
Dominique Charron^b, André Ménez, B. Maillère^{a,*}

^a Protein Engineering and Research Department, bat 152, CEA-Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France

^b INSERM U662, Hôpital St Louis, 75475 Paris Cedex 10, France

Received 20 April 2006; received in revised form 26 June 2006; accepted 4 October 2006

Available online 26 October 2006

Abstract

We have set up a method to predict peptide binding to HLA-DP4 molecules. These HLA II molecules are the most frequent worldwide and hence are an interesting target for epitope-based vaccines. The prediction is based on quantitative matrices built with binding data for peptides substituted at anchoring positions for HLA-DP4. A set of 98 peptides of various origins was used to compare the prediction with binding activity. At different prediction thresholds, the positive predictive value and the sensitivity of the prediction ranged from 50% to 80%, demonstrating its efficiency. This prediction method can be applied to the entire genomes of pathogens and large peptide sequences derived from tumor antigens.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HLA-DP4; Prediction; T cell epitope; Binding assay

1. Introduction

In humans, peptide presentation to CD4+ T lymphocytes is ensured by three different HLA II molecules, namely HLA-DR, HLA-DQ and HLA-DP. These molecules remarkably share a highly conserved 3D-structure and accommodate the peptides in the same extended conformation (Stern et al., 1994). However, they bind different repertoires of peptides because of the broad polymorphism that characterizes the HLA II molecules. The peptide-binding groove is in fact composed of five specificity pockets (numbered P1, P4 P6 P7 and P9) and contains multiple polymorphic residues (Stern et al., 1994).

Each pocket accommodates a side-chain of the antigenic peptide and therefore determines which amino acids are tolerated in it. As a result, each HLA II molecule is characterized by a peptide-binding motif, which is defined by the amino acid preferences of its specificity pockets (Rammensee et al., 1995). As binding motifs are found in the best peptide binders, they have been used to identify potential CD4+ T cell epitopes in primary sequences of antigens (Sette et al., 1989). More sophisticated approaches of peptide prediction are based on artificial neural networks (Brusic et al., 1998) and quantitative matrices (Southwood et al., 1998; Sturniolo et al., 1999) (for a review see (Brusic et al., 2004)). Many CD4+ T cell epitopes have been identified using quantitative matrices, demonstrating the efficiency of this approach (Southwood et al., 1998; De Lalla et al., 1999; Manici et al., 1999; Sturniolo et al., 1999; Cochlovius et al., 2000; Wilson et al., 2001). This approach supposes that each amino acid in the peptide sequence

* Corresponding authors. Tel.: +33 1 69 08 94 47; fax: +33 1 69 08 90 71.

E-mail addresses: busson@neptune.chu-stlouis.fr (M. Busson), bernard.maillere@cea.fr (B. Maillère).

contributes independently to the affinity of the peptide binding and hence that amino acid values at each position can be added to define a score of prediction. Independency of the side-chains has been clearly confirmed for HLA-DR molecules (Hammer et al., 1994), although side chains effects were found interdependent for HLA-DQ molecules. (Raddrizzani et al., 1997). Prediction of peptide binders to HLA-DP molecules has never been proposed, although multiple HLA-DP restricted T cell epitopes have been described in various antigens (Wyss-Coray et al., 1992; Schultz et al., 2000; Zeng et al., 2001; Castelli et al., 2002; De Graaff et al., 2004; Mandic et al., 2005). Very few binding data are available in fact (Dong et al., 1995; Chiciz et al., 1997; Castelli et al., 2002; Berretta et al., 2003). However, two HLA-DP molecules appear particularly interesting as peptide-presenting molecules, namely the HLA-DP4 molecules.

HLA-DP4 molecules mainly comprise the molecules HLA-DP401 (DPA1*0103/DPB1*0401) and HLA-DP402 (DPA1*0103/DPB1*0402), which differ by only three residues and exhibit a very similar binding motif (Castelli et al., 2002). Allele frequency of HLA-DP401 and HLA-DP402 in the Caucasian population is approximately of 40% and 11%, respectively. Together, they are carried by approximately 76% of Caucasians. They are present worldwide at an allelic frequency of 20 to 60% and are the most frequent human HLA II alleles. CD4⁺ T cell epitopes restricted to HLA-DP4 are therefore expected to be recognized by a large proportion of individuals. The high frequency of HLA-DP4 molecules constitutes an opportunity for the design of epitope-based vaccine but no prediction method exists to identify potential HLA-DP4 restricted CD4⁺ T cell epitopes. We therefore set up a binding prediction method specific for HLA-DP4 molecules.

2. Material and methods

2.1. Peptides and antigens

Peptides were synthesized using standard Fmoc chemistry on a multiple peptide synthesizer APEX 396 (Advanced Chemtech, Louisville, KY). They were cleaved from the resin by 95% trifluoroacetic acid. Peptides, which exhibited a purity lower than 80%, were purified by RP-HPLC on a C₁₈ Vydac column (Interchim, Montluçon, France). The peptide bOxy 271–287 was biotinylated with biotinyl-6-aminocaproic acid (Fluka Chimie, St Quentin Fallavier, France) on the N-terminus before cleavage from the resin and HPLC purification.

2.2. HLA-DP4-specific peptide-binding assays

EBV homozygous cell lines PITOUT (DPA1*0103, DPB1*0401), HOM2 (DPA1*0103, DPB1*0401) and SCHU (DPA1*0103, DPB1*0402) were a kind gift from Dr C. de Toma and Prof. J. Dausset (CEPH, Paris). They were used as sources of human HLA-DP4 molecules. B7/21 hybridoma was a kind gift from Dr. Y. van de Wal (Department of Immunohematology and Blood Bank, Leiden, The Netherlands). Mab B7/21 was immunopurified from cell culture supernatants on Sepharose Protein A gel as recommended by the manufacturer (Amersham Pharmacia Biotech, Les Ulis, France). HLA-DP4 molecules were purified by affinity chromatography using B7/21 Mab coupled to protein A Sepharose CL 4B gel (Pharmacia Biotech) as described previously for L243 Mab (Texier et al., 2000). Binding assays were performed by competitive ELISA as described previously (Castelli et al., 2002). Briefly, 10 nM bOxy 271–287 peptide, an appropriate dilution of HLA-DP4 molecules, and serial dilutions of the peptide to be tested were incubated at 37 °C for 24 h. Samples were then neutralized and applied to B7/21-coated plates for 2 h. Bound biotinylated peptide was detected by means of streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Amersham, Little Chalfont, U.K.) and 4-methylumbelliferyl phosphate substrate (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Emitted fluorescence was measured at 450 nm upon excitation at 365 nm in a Victor II spectrofluorimeter (Perkin Elmer Instruments, Les Ulis, France). Concentration that prevented binding of 50% of the labeled peptide (IC₅₀) was measured, IC₅₀ values of the Oxy 271–287 peptide serving as a reference in each experiment. Data were expressed as relative activity and correspond to the ratio between the IC₅₀ of the peptide and that of the reference.

2.3. Statistical evaluation

All computer procedures were written on a PC (Windows XP) as Excel macros in Visual Basic Application. The binding threshold discriminates the active peptides to the inactive peptides in the binding assays. Peptides that bind to HLA-DP4 with an IC₅₀ below 100 nM are high binders while IC₅₀ below 1000 nM correspond to binders. The prediction threshold corresponds to the limit of selection of the peptide by the prediction method. For defined binding and prediction thresholds, 2×2 tables were built. They contained the number of correctly predicted active peptides (true positives, TP), of correctly predicted inactive peptides (true negatives, TN), of incorrectly

Table 1

Binding of Oxy 273–285 peptide substituted at the P1 P4 P6 and P9 positions to HLA-DP4 molecules

| Peptides | Sequences | Relative activity | |
|-------------|----------------|-------------------|--------------|
| | 1 4 6 9 | DP401 | DP402 |
| Oxy 273–285 | KYFAATQFEPLAA | 1 (±0) | 1 (±0) |
| Oxy F275D | KYDAATQFEPLAA | 150 (±18) | 57 (±13) |
| Oxy F275G | KYGAATQFEPLAA | 159 (±32) | 55 (±7) |
| Oxy F275H | KYHAATQFEPLAA | 147 (±70) | 36 (±18) |
| Oxy F275I | KYIAATQFEPLAA | 3 (±1) | 2 (±0.3) |
| Oxy F275M | KYMAATQFEPLAA | 3 (±3) | 3 (±11) |
| Oxy F275P | KYPAATQFEPLAA | 95 (±110) | 48 (±21) |
| Oxy F275Q | KYQAATQFEPLAA | 260 (±153) | 97 (±15) |
| Oxy F275R | KYRAATQFEPLAA | 137 (±100) | 54 (±37) |
| Oxy F275S | KYSAATQFEPLAA | 158 (±165) | 42 (±1) |
| Oxy F275V | KYVAATQFEPLAA | 11 (±8) | 6 (±3) |
| Oxy F275W | KYWAATQFEPLAA | 0.5 (±0.1) | 1 (±1) |
| Oxy T278G | KYFAAGQFEPLAA | 1 (±0.2) | 2 (±1) |
| Oxy T278P | KYFAAPQFEPLAA | 3 (±0.3) | 2 (±0.4) |
| Oxy T278H | KYFAAHQFEPLAA | 6 (±6) | 2 (±0.2) |
| Oxy F280D | KYFAATQDEPLAA | 2713 (±3435) | 117 (±200) |
| Oxy F280G | KYFAATQGEPLAA | 7150 (±3778) | 3751 (±1133) |
| Oxy F280H | KYFAATQHEPLAA | 2477 (±1919) | 214 (±137) |
| Oxy F280I | KYFAATQIEPLAA | 7 (±6) | 6 (±4) |
| Oxy F280M | KYFAATQMEPLAA | 4 (±1) | 1 (±3) |
| Oxy F280P | KYFAATQPEPLAA | 209 (±171) | 12 (±4) |
| Oxy F280Q | KYFAATQQEPLAA | 7150 (±3778) | 232 (±154) |
| Oxy F280R | KYFAATQREPLAA | 7150 (±3778) | 367 (±247) |
| Oxy F280S | KYFAATQSEPLAA | 505 (±317) | 33 (±17) |
| Oxy F280V | KYFAATQVEPLAA | 42 (±26) | 22 (±42) |
| Oxy F280C | KYFAATQCEPLAA | 17 (±11) | 2 (±1) |
| Oxy L283G | KYFAATQFEPGAA | 15 (±8) | 12 (±7) |
| Oxy L283H | KYFAATQFEPHAA | 13 (±26) | 35 (±16) |
| Oxy L283I | KYFAATQFEPIAA | 1 (±0.4) | 3 (±2) |
| Oxy L283P | KYFAATQFEPPIAA | 9 (±8) | 3 (±4) |
| Oxy L283Q | KYFAATQFEPQAA | 8 (±6) | 2 (±3) |
| Oxy L283S | KYFAATQFEPQAA | 9 (±10) | 5 (±10) |
| Oxy L283T | KYFAATQFEPTAA | 5 (±30) | 3 (±4) |
| Oxy L283W | KYFAATQFEPWAA | 1 (±1) | 13 (±12) |

Binding of substituted peptides to HLA-DP401 and HLA-DP402 was assessed by ELISA as described in the Materials and Methods section. Results are reported as relative activity (ratio between native and substituted peptide IC₅₀). Geometric means and S.D. were calculated from two to three independent experiments. Amino acids in bold correspond to anchor residues.

predicted active peptides (false positives, FP) and of incorrectly predicted inactive peptides (false negatives, FN). The chi-squares were calculated with the 2×2 tables to evaluate whether the prediction was significant. Positive predictive value (PPV), sensitivity and specificity of the prediction were deduced from the 2×2 tables as follows. PPV corresponds to the percentage of correctly predicted binders among the predicted peptides and was calculated as $PPV = (\text{number of true positives}) / (\text{number of peptides predicted to be active})$. $PPV = (TP / (TP + FP))$. Sensitivity of the prediction methods characterizes the probability that the binders are

effectively predicted and was calculated as $(\text{number of true positives}) / (\text{number of active peptides}) = (TP / (TP + FN))$. The specificity of a prediction method characterizes the probability that inactive peptides are correctly predicted and was calculated as $(\text{number of true negatives}) / (\text{number of inactive peptides}) = (TN / (FP + TN))$. Specificity and sensitivity were calculated systematically for a given binding activity threshold at different prediction thresholds, ranging from 10 to 10,000 nM.

3. Results

3.1. Definition of quantitative matrices for prediction of binding to HLA-DP4 molecules

In order to define quantitative matrices for prediction of binding to HLA-DP4 molecules, we first complemented our recently published binding data on mono-substituted analogs of the Oxy 273–285 peptide (Castelli et al., 2002). This peptide derives from a naturally processed peptide eluted from an HLA-DP401 molecule (Falk et al., 1994). As the alanine and lysine scanning did not highlight any binding loss of analogs

Table 2

The prediction matrices for binding to HLA-DP401 and HLA-DP402 molecules were built using binding data and estimates

| Amino acids | DP401 Pockets | | | | DP402 Pockets | | | |
|-------------|---------------|------|------|------|---------------|------|------|------|
| | 1 | 4 | 6 | 9 | 1 | 4 | 6 | 9 |
| A | 1.60 | 0.00 | 2.38 | 0.60 | 0.85 | 0.00 | 1.88 | 0.60 |
| D | 1.70 | 0.30 | 3.32 | 0.85 | 1.76 | 0.30 | 3.85 | 0.90 |
| E | 1.85 | 0.30 | 2.90 | 1.04 | 1.85 | 0.48 | 2.90 | 0.90 |
| F | 0.00 | 0.30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.70 |
| G | 2.20 | 0.00 | 3.85 | 1.18 | 1.76 | 0.00 | 3.57 | 1.08 |
| H | 2.17 | 0.78 | 3.40 | 1.11 | 1.56 | 0.30 | 2.33 | 1.54 |
| I | 0.48 | 0.30 | 0.85 | 0.00 | 0.30 | 0.30 | 0.78 | 0.48 |
| K | 2.60 | 1.48 | 2.43 | 1.85 | 2.28 | 0.70 | 2.28 | 1.90 |
| L | 0.48 | 0.30 | 0.78 | 0.00 | 0.48 | 0.30 | 0.70 | 0.00 |
| M | 0.48 | 0.30 | 0.60 | 0.00 | 0.48 | 0.30 | 0.00 | 0.30 |
| N | 2.32 | 0.60 | 3.15 | 1.15 | 1.78 | 0.60 | 3.08 | 0.85 |
| P | 1.98 | 0.48 | 2.32 | 0.95 | 1.68 | 0.30 | 1.08 | 0.48 |
| Q | 2.41 | 0.60 | 3.85 | 0.90 | 1.99 | 0.60 | 2.36 | 0.30 |
| R | 2.14 | 1.15 | 3.85 | 1.70 | 1.73 | 0.70 | 2.57 | 1.60 |
| S | 2.20 | 0.30 | 2.70 | 0.95 | 1.62 | 0.48 | 1.52 | 0.70 |
| T | 2.15 | 0.00 | 2.85 | 0.60 | 1.85 | 0.00 | 2.48 | 0.60 |
| V | 1.04 | 0.15 | 1.62 | 0.30 | 0.78 | 0.15 | 1.34 | 0.30 |
| W | 0.00 | 0.30 | 0.30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.30 | 1.11 |
| Y | 0.48 | 0.60 | 0.30 | 0.30 | 0.48 | 0.00 | 0.48 | 1.18 |
| C | 2.32 | 0.60 | 1.23 | 1.15 | 1.78 | 0.60 | 0.30 | 0.85 |

Prediction values are the log₁₀ of relative activity of the corresponding analog. Values in light and dark gray backgrounds correspond to data from Castelli et al. (2002) and from this paper, respectively. Values on a white background were estimated from those obtained with equivalent amino acids.

substituted in the P7 pocket, we did not consider this pocket and investigated the influence of amino acid substitutions in the P1, P4, P6 and P9 pockets only (Table 1). In agreement with previous binding data, we confirmed the major role of aliphatic and aromatic residues in the P1 and P6 pockets on the binding and that introducing other amino acids at either P1 or P6 position resulted in marked reduction of binding. In contrast, the P4 and P9 pockets gave rise to moderate effects as previously observed (Castelli et al., 2002). All the binding data were then listed in two separate tables as the logarithm of the binding loss observed with the Oxy 273–285 peptide (Table 2). Sixteen values were lacking in the minor P4 and P9 pockets and represented 10% of the 160 values contained in each table. They were estimated by those obtained with similar amino acids. More precisely, isoleucine and methionine were likened to leucine, glutamine and cysteine to asparagine, and tryptophan was likened to phenylalanine. The effect of introducing a valine was estimated as the average of the effects obtained with leucine and alanine. These estimates were supported by the effects observed in the P1 and P6 pockets, which were almost entirely investigated (Table 2). In a similar way to the TEPITOPE

prediction program (Sturniolo et al., 1999), a prediction score for a 9-mer sequence was calculated as the sum of the matrix values of the corresponding amino acids at positions P1, P4, P6 and P9 and was converted into the expected IC_{50} . The assignment of the predicted IC_{50} to all the 9-mer peptide sequences contained in a target antigen or genome allows the selection of the peptides that exhibit the lowest predicted IC_{50} and, hence, which are the potential HLA-DP4 restricted T cell epitopes.

3.2. Evaluation of the prediction of binding to HLA-DP401 and HLA-DP402 molecules

To evaluate the prediction method, we used a set of 98 different peptides. This set comprised 30 overlapping peptides encompassing the sequence of the major bee venom allergen, 52 of the HCV Core and NS3 proteins, and 6 peptides of the HIV Nef protein. We also included peptides which were previously described as HLA-DP4 CD4+ T cell epitopes (Castelli et al., 2002) (Celis et al., 1990; Wyss-Coray et al., 1992; Falk et al., 1994; Koelle et al., 2000). All the peptides were submitted to HLA-DP401 and HLA-DP402 specific binding assays and to the binding prediction. With a binding threshold of

Table 3
Binding activity and prediction of HLA-DP4 binder peptides

| Peptides | Sequences | DP401 | | DP402 | |
|------------------|---|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | | IC_{50} Obs | IC_{50} Pred | IC_{50} Obs | IC_{50} Pred |
| TT | FNN ETV SFWLR V PKVSASHLE | 5 | 80 | 7 | 120 |
| OXY 271-286 | EKKY FAATQ FEPLAARL | 9 | 10 | 10 | 10 |
| HSV 283-302 | REL WWV FYAGDRALEEPHAE | 23 | 594 | 20 | 1018 |
| NY-ESO-1 158-180 | LLM WITQ CFLPVFLAQPSPGQRR | 30 | 40 | 70 | 40 |
| IL 127-146 | GPAPAD VQYD LYLNVANRR | 30 | 880 | 30 | 720 |
| NSP2 | GVQIVRQ IRSGER FLK W SQ | 40 | 2740 | 40 | 4860 |
| NY-ESO-1 119-143 | PGVLLKEFTVSGN IL TIRLTAA D HR | 100 | 1440 | 100 | 800 |
| NY-ESO-1 87-111 | LLE F YLAMPFAT M EAELARRSLAQ | 186 | 540 | 87 | 180 |
| MAGE 245-258 | LLT Q H FVQ ENYLEY | 250 | 80 | 400 | 480 |
| NEF 132-147 | GVRYP L TFGWCYKL V P | 250 | 510 | 350 | 60 |
| HCV 1554-1568 | HLE F WEGVFTGL T HI | 347 | 10 | 315 | 10 |
| API 77-94 | TISSY F VGKMYFN L IDTK | 450 | 220 | 175 | 150 |
| HIV NEF 66-94 | VGFPVTPQ V LRPMTYKAA V DLSHFLKEK | 500 | 480 | 100 | 720 |
| HCV 1275-1304 | DPNIRGTGVRTIT TG SP IT YSTY GK FLADGG | 548 | 120 | 1825 | 900 |
| HCV 1552-1583 | QDHLE F WEGVFTGL T HIDAHFLSQTKQSGENL | 575 | 10 | 615 | 10 |
| HCV 27-41 | GGQ L VGGVYLL F RRG | 667 | 540 | 188 | 180 |
| NEF 117-147 | TQGYFPDWQNYTPGPGVRY P LTFGW CY KL V P | 800 | 510 | 2500 | 60 |
| HCV 1524-1553 | GCAY YEL TPA ET TVR | 12051 | 16720 | 1119 | 960 |
| HCV 1524-1538 | GCAY YEL TPA ET TVRLRAYMNT P GLPVCQD | 6296 | 7560 | 141 | 960 |
| HCV 1538-1552 | RL RAYMNT P GLPVCQ | 1711 | 7560 | 182 | 1620 |
| HCV 1007-1021 | GRE LL GPADGM V SK | 100000 | 7200 | 350 | 3000 |
| HCV 19-47 | PQDV K FPGGGQ L VGGVYLL F RRGPRLGVR | 4524 | 540 | 750 | 180 |
| HCV 1007-1037 | GRE ILL GPADGM V SKGWRL L APITAYAAQQTR | 70250 | 1800 | 881 | 300 |

Active peptides were retrieved from previous binding experiments. The P1 to P9 core binding regions are bracketed. IC_{50} values below the binding threshold of 1000 nM are in bold.

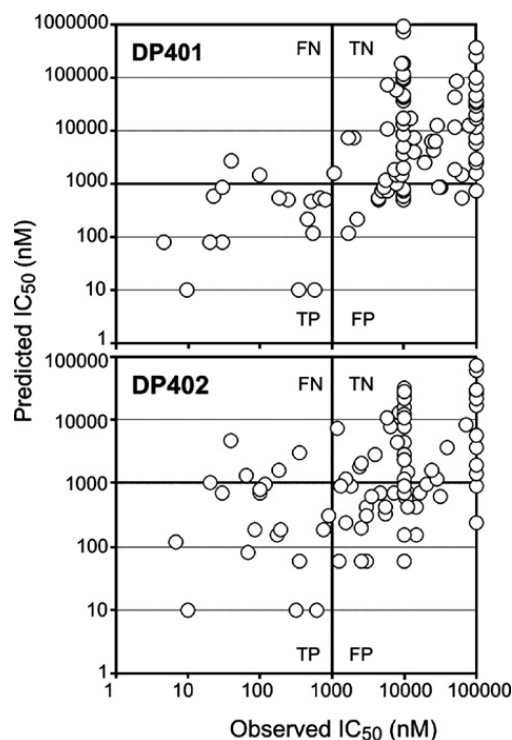


Fig. 1. Correlation between predicted and observed IC_{50} for HLA-DP4 molecules. Ninety-eight peptides were submitted to HLA-DP4 binding and prediction. Observed and predicted IC_{50} are indicated in the upper panel for HLA-DP401 and the lower panel for HLA-DP402. Bold bars represent the binding (vertical) and predicted (horizontal) thresholds. TP, true positives; TN, true negatives; FP, false positives and FN, false negatives.

1000 nM, 17 and 21 peptides were active towards HLA-DP401 and HLA-DP402, respectively (Table 3). Fourteen peptides bound to both molecules.

The predicted IC_{50} could theoretically vary from 10 to 10^{10} nM, although the experimental data were limited to 10 000 or 100 000 nM. Correlations between predicted and observed IC_{50} are presented Fig. 1 and the peptides were segregated into 4 different quadrants (false negatives, FN; true negatives, TN; true positives, TP and false positives, FP) on the basis of prediction and binding threshold of 1000 nM (see definitions in the Material and Methods section). More precisely, peptides predicted to be active had a predicted IC_{50} below the prediction threshold (1000 nM) while peptides effectively active in the binding assays had an observed IC_{50} below the binding threshold (also 1000 nM). Thirty-one peptides were expected to be active towards HLA-DP401 (TP+FP) and did in fact comprise 15 active peptides (TP) (Table 3). Almost half of the peptides that were predicted to be active did indeed bind to HLA-DP401. Only two active peptides were not predicted (FN), namely NSP2 and NY-ESO-1 119-143 as they exhibited a partial binding motif suggesting they may

adopt a different binding mode (Table 3). The correlation between predicted and observed IC_{50} was clearly significant ($\chi^2=37.27$, $p=10^{-9}$). It was also significant for HLA-DP402 ($\chi^2=7.94$, $p=0.005$), although one third (15 peptides) of the peptides predicted to be active (46 peptides) (TP+FP) did indeed bind to HLA-DP402 (TP).

The difficulty to use a prediction method is first to decide which peptides are retained by the prediction and hence to define the prediction threshold. In order to choose the prediction threshold accurately, we evaluated its influence on the efficiency of the prediction. We therefore calculated the positive predictive value (PPV), the sensitivity and specificity as a function of the prediction threshold (Fig. 2) by using the data obtained with the set of 98 peptides. In the binding assays, we distinguished the binders ($IC_{50} \leq 1000$ nM) from the high binders ($IC_{50} \leq 100$ nM). We therefore considered these two binding thresholds to evaluate the influence of the prediction threshold. For HLA-DP401 (Fig. 2, left panels), the selection of a stringent prediction threshold of 100 nM retains only peptides with an observed IC_{50} below 1000 nM and hence active peptides (PPV = 100%) (Fig. 2, panel A, open circles). However, only one third of the active peptides are found by the prediction (sensitivity = 35%) (Fig. 2, panel B, open circles). The coverage of the active peptides is advantageously enhanced by the choice of a prediction threshold close to 1000 nM (sensitivity = 88%) (Fig. 2, panel B, open circles), but in this case only half of the predicted peptides are active (PPV = 50%) (Fig. 2, panel A, open circles). Similar observations are made for the HLA-DP402 molecule, although the maximum PPV is 70%. Prediction of very good binders (closed circles) unfortunately appears less efficient, especially for HLA-DP402. The PPV does not exceed 27% (Fig. 2, panel D, closed circles) with a sensitivity of 37% (Fig. 2, panel E, closed circles), while it becomes very weak at a higher prediction threshold (Fig. 2, panel D, closed circles). In contrast, at a binding threshold of 100 nM, prediction of peptide binders to HLA-DP401 peaks at 70% PPV (Fig. 2, panel A, closed circles), while half of the highly active peptides are found by the prediction (sensitivity = 50%) (Fig. 2, panel B, closed circles). Again, a better coverage of the highly active peptides can be reached at a higher prediction threshold (Fig. 2, panel B, closed circles), but the PPV will decrease to 20% (Fig. 2, panel A, closed circles). Whatever the selection of the prediction threshold for both HLA-DP4 molecules, the specificity of the prediction i.e. the probability of correctly predicting the non-binder peptides, remains high and is higher than 75% and 60% for HLA-DP401 and HLA-DP402, respectively

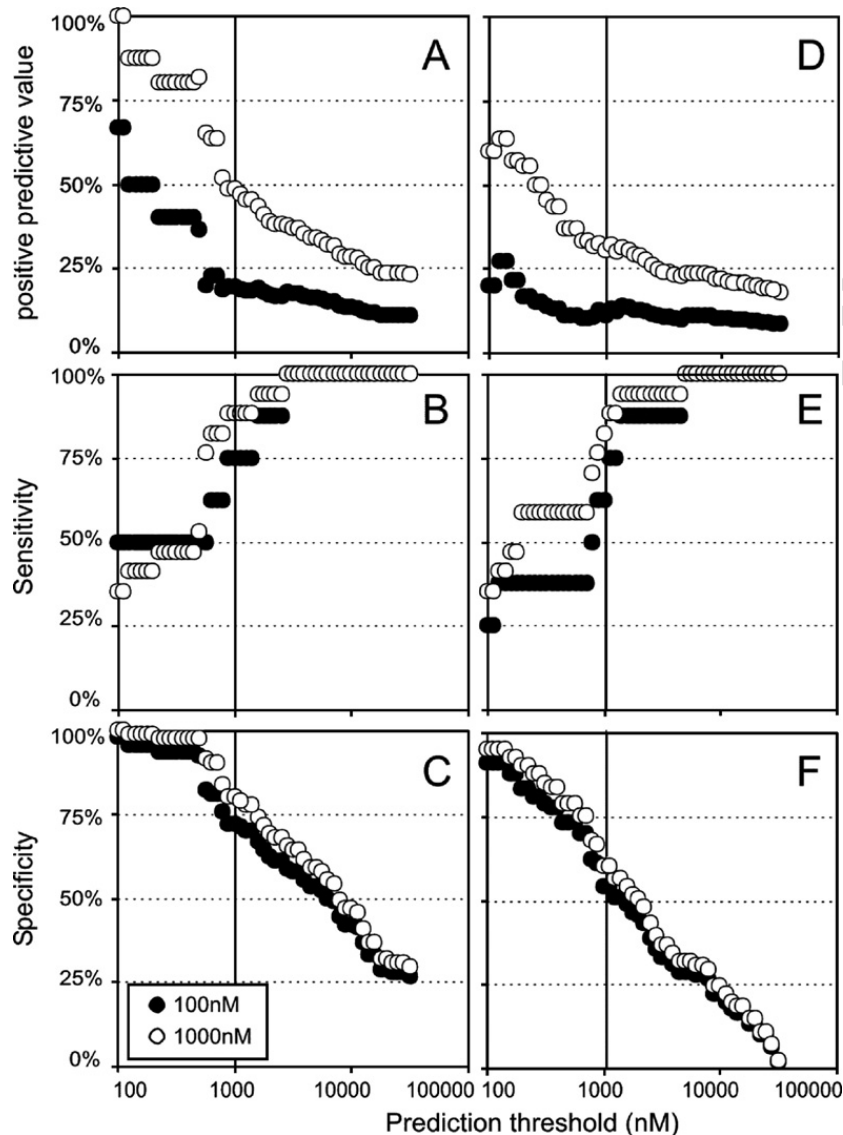


Fig. 2. Influence of the prediction threshold on the prediction efficiency. Positive predictive value (A, D), sensitivity (B, E) and specificity (C, F) of the prediction of binding to HLA-DP401 (left panels) and HLA-DP402 (right panels) were calculated for two different binding thresholds: 100 nM for high binders (closed circles) and 1000 nM for binders (open circles) as functions of the prediction threshold.

(Fig. 2, panels C and F). Altogether we conclude that the prediction threshold can be selected at different levels of stringency between 100 nM and 1000 nM and efficiently identify active peptides.

4. Concluding remarks

In this paper we report a new prediction method to identify HLA-DP4 restricted peptides, and instruct potential users how to select the prediction threshold. Comparison of the experimental and predicted values presented in this paper demonstrates the efficiency of the prediction. Positive prediction values (percentage of true positives among the predicted peptides) and the

sensitivity (percentage of true positives among the active peptides) ranged from 50% to 80% depending on the selection of the prediction threshold. They are higher than those described for prediction methods based on binding motifs (Brusic et al., 2004) and are in line with methods based on quantitative matrices as TEPITOPE (Sturniolo et al., 1999).

The selection of prediction thresholds is a compromise between maximization of the PPV and sensitivity. In our experience, sensitivity is technically difficult to maximize as it can dramatically enhance the number of peptides to be synthesized. We have recently applied the method of predicting binding to HLA-DP4 to the whole genome of HIV (Cohen et al., 2006) and to the MAGE-A

tumor antigen family (Wang et al., in press). Besides the present paper, which focuses on the prediction method, these two papers describe the T cell stimulating properties of peptides selected by the prediction of binding to HLA-DP4. In both papers, we selected intermediate prediction thresholds of 300 nM and 500 nM. We synthesized 21 and 12 peptides for each study, respectively. As expected, 87% of these peptides exhibited a binding capacity for HLA-DP4, 33% being high-affinity binders. These experiments illustrate the potency of this prediction method in identifying HLA-DP4 restricted T cell epitopes for the development of peptide-based vaccines and in immunomonitoring of the cellular immune response.

Acknowledgements

We thank Gaetan Munier, Sandrine Farci and Sandra Pouveller-Moratille for technical assistance.

References

- Berretta, F., Butler, R.H., Diaz, G., Sanarico, N., Arroyo, J., Fraziano, M., Aichinger, G., Wucherpennig, K.W., Colizzi, V., Saltini, C., Amicosante, M., 2003. Detailed analysis of the effects of Glu/Lys beta69 human leukocyte antigen-DP polymorphism on peptide-binding specificity. *Tissue Antigens* 62, 459.
- Brusic, V., Honeyman, G., Hammer, J., Harrison, L., 1998. Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural network. *Bioinformatics* 14, 121.
- Brusic, V., Bajic, V.B., Petrovsky, N., 2004. Computational methods for prediction of T-cell epitopes — a framework for modelling, testing, and applications. *Methods* 34, 436.
- Castelli, F.A., Buhot, C., Sanson, A., Zarour, H., Pouveller-Moratille, S., Nonn, C., Gahery-Segard, H., Guillet, J.G., Menez, A., Georges, B., Maillere, B., 2002. HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity. *J. Immunol.* 169, 6928.
- Celis, E., Larson, J., Otvos, L., Wunner, W.H., 1990. Identification of a rabies virus T cell epitope on the basis of its similarity with a hepatitis B surface antigen peptide presented to T cells by the same MHC molecule (HLA-DPw4). *J. Immunol.* 145, 305.
- Chicz, R.M., Graziano, D.F., Trucco, M., Strominger, J.L., Gorga, J.C., 1997. HLA-DP2: self peptide sequences and binding properties. *J. Immunol.* 159, 4935.
- Cochlovius, B., Stassar, M., Christ, O., Radrizzani, L., Hammer, J., Mytilineos, I., Zoller, M., 2000. In vitro and in vivo induction of a Th cell response toward peptides of the melanoma-associated glycoprotein 100 protein selected by the TEPITOPE program. *J. Immunol.* 165, 4731.
- Cohen, W.M., Pouveller-Moratille, S., Wang, X.F., Farci, S., Munier, G., Charron, D., Menez, A., Busson, M., Maillere, B., 2006. Scanning the HIV Genome for CD4+ T Cell Epitopes Restricted to HLA-DP4, the Most Prevalent HLA Class II Molecule. *J. Immunol.* 176, 5401.
- de Graaff, P.M., Heidema, J., Poelen, M.C., van Dijk, M.E., Lukens, M.V., van Gestel, S.P., Reinders, J., Rozemuller, E., Tilanus, M., Hoogerhout, P., van Els, C.A., van der Most, R.G., Kimpen, J.L., van Bleek, G.M., 2004. HLA-DP4 presents an immunodominant peptide from the RSV G protein to CD4 T cells. *Virology* 326, 220.
- de Lalla, C., Sturniolo, T., Abbruzzese, L., Hammer, J., Sidoli, A., Sinigaglia, F., Panina-Bordignon, P., 1999. Cutting edge: identification of novel T cell epitopes in Lol p5a by computational prediction. *J. Immunol.* 163, 1725.
- Dong, R.P., Kamikawaji, N., Toida, N., Fujita, Y., Kimura, A., Sasazuki, T., 1995. Characterization of T cell epitopes restricted by HLA-DP9 in streptococcal M12 protein. *J. Immunol.* 154, 4536.
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., Rammensee, H.G., 1994. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* 39, 230.
- Hammer, J., Bono, E., Gallazzi, F., Belunis, C., Nagy, Z., Sinigaglia, F., 1994. Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J. Exp. Med.* 180, 2353.
- Koelle, D.M., Reymond, S.N., Chen, H., Kwok, W.W., McClurkan, C., Gyaltsong, T., Petersdorf, E.W., Rotkis, W., Talley, A.R., Harrison, D.A., 2000. Tegument-specific, virus-reactive CD4 T cells localize to the cornea in herpes simplex virus interstitial keratitis in humans. *J. Virol.* 74, 10930.
- Mandic, M., Castelli, F., Janjic, B., Almunia, C., Andrade, P., Gillet, D., Brusic, V., Kirkwood, J.M., Maillere, B., Zarour, H.M., 2005. One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4+ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J. Immunol.* 174, 1633.
- Manici, S., Sturniolo, T., Imro, M.A., Hammer, J., Sinigaglia, F., Noppen, C., Spagnoli, G., Mazzi, B., Bellone, M., Dellabona, P., Protti, M.P., 1999. Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J. Exp. Med.* 189, 871.
- Radrizzani, L., Sturniolo, T., Guenot, J., Bono, E., Gallazzi, F., Nagy, Z.A., Sinigaglia, F., Hammer, J., 1997. Different modes of peptide interaction enable HLA-DQ and HLA-DR molecules to bind diverse peptide repertoires. *J. Immunol.* 159, 703.
- Rammensee, H.G., Friede, T., Stevanovic, S., 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178.
- Schultz, E.S., Lethe, B., Cambiaso, C.L., Van Snick, J., Chaux, P., Corthals, J., Heirman, C., Thielemans, K., Boon, T., van der Bruggen, P., 2000. A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4+ cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res.* 60, 6272.
- Sette, A., Buus, S., Appella, E., Smith, J.A., Chesnut, R., Miles, C., Colon, S.M., Grey, H.M., 1989. Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3296.
- Southwood, S., Sidney, J., Kondo, A., del Guercio, M.F., Appella, E., Hoffman, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., Sette, A., 1998. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J. Immunol.* 160, 3363.
- Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C., 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368, 215.
- Sturniolo, T., Bono, E., Ding, J., Radrizzani, L., Tuereci, O., Sahin, U., Braxenthaler, M., Gallazzi, F., Protti, M.P., Sinigaglia, F., Hammer, J., 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat. Biotechnol.* 17, 555.

- Texier, C., Pouvelle, S., Busson, M., Herve, M., Charron, D., Menez, A., Maillere, B., 2000. HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. *J. Immunol.* 164, 3177.
- Wang, X.F., Cohen, W.M., Castelli, F.A., Almunia, C., Lethe, B., Pouvelle-Moratille, S., Munier, G., Charron, D., Menez, A., Zarour, H.M., van der Bruggen, P., Busson, M., Maillere, B., in press. Selective identification of HLA-DP4 binding T cell epitopes encoded by the MAGE-A gene family. *Cancer Immunol. Immunother.*
- Wilson, C.C., Palmer, B., Southwood, S., Sidney, J., Higashimoto, Y., Appella, E., Chesnut, R., Sette, A., Livingston, B.D., 2001. Identification and antigenicity of broadly cross-reactive and conserved human immunodeficiency virus type 1-derived helper T-lymphocyte epitopes. *J. Virol.* 75, 4195.
- Wyss-Coray, T., Brander, C., Frutiger, K., Pichler, W.J., 1992. Discrimination of human CD4 T cell clones based on their reactivity with antigen-presenting T cells. *Eur. J. Immunol.* 22, 2295.
- Zeng, G., Wang, X., Robbins, P.F., Rosenberg, S.A., Wang, R.F., 2001. CD4(+) T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3964.

Chapitre 7

Identification Sélective d'épitopes T CD4+ restreints aux molécules HLA-DP4 dans les antigènes tumoraux MAGE-A

7.1 Les antigènes MAGE-A

7.1.1 Nature des gènes et expression

En 1991, le groupe de recherche dirigé par Thierry Boon a rapporté la découverte d'un gène codant un antigène reconnu par des CTL dans un mélanome humain [van der Bruggen et al., 1991]. Ce gène s'est avéré plus tard appartenir à un groupe de 12 gènes appelés MAGE-A et situés dans la région q28 du chromosome X [De Plaen et al., 1994]. Ce gène a été plus tard appelé MAGE-A1 (premier antigène de mélanome). Comme MAGE-A1, les 11 gènes additionnels de MAGE-A ont leur séquence codante entièrement située dans le dernier exon, qui ont de (64%-85% d'identité avec celui de MAGE-A1) [De Plaen et al., 1994]. La grande famille MAGE est le prototype des gènes spécifiques des tumeurs (ou cancer testis) se composant de 24 gènes qui appartiennent à trois sous-familles : MAGE-A, - B, et - C, situé dans trois régions différentes du chromosome de X. Par exemple, MAGE-B se situe dans la région Xp21, et MAGE-C se situe dans la région Xq26-27.

Depuis la découverte originelle du gène *MAGE-A1* dans les mélanomes, de nombreux investigateurs ont constaté que la famille *MAGE-A* n'est pas uniquement spécifique des mélanomes. Des degrés variables d'expression de *MAGE-A* ont été trouvés dans des tumeurs de différents types (Tab. 7.1). En effet, l'expression de *MAGE-A* est induite par la déméthylation du promoteur. Ainsi, l'instabilité génétique dans les cellules causant la perte de ce contrôle de méthylation a pu avoir pour conséquence l'expression préférentielle des gènes de *MAGE-A* dans les cellules cancéreuses [Itoh et al., 1996]. Ils sont complètement silencieux dans les tissus normaux, excepté les cellules germinales masculines, et pour certains d'entre eux, le placenta.

Le rôle des gènes de la famille de *MAGE-A* n'est pas clairement identifié. Comme l'expression de ces gènes a été trouvée principalement dans les cellules cancéreuses de différentes origines histologiques, une supposition raisonnable est que ces gènes soient impliqués dans la carcinogenèse et/ou la progression de la tumeur. Cependant, il n'existe pas de corrélation systématique entre l'évolutivité des tumeurs et l'expression.

L'intérêt clinique de la famille de gènes *MAGE-A* peut être considérée en termes : (a) d'immunothérapie anticancéreuse ou de (b) détection de tumeur et surveillance de la maladie.

7.1.2 Immunothérapie anticancéreuse basée sur *MAGE-A*

La nature spécifique de l'expression des antigènes *MAGE-A* dans les tumeurs fait de ces antigènes des cibles privilégiées pour l'immunothérapie anticancéreuse.

Les principaux essais d'immunothérapie basés sur *MAGE-A* ont été effectués au moyen de vaccins se composant de peptides. Les peptides antigéniques principaux utilisés pour vacciner les patients atteints de mélanome sont inclus dans la Tab. 7.2.

Les investigations initiales concernant les réponses CTLs des patients vaccinés avec des antigènes de *MAGE-A* ont indiqué que ces réponses étaient faibles [Boon et al., 2006]. Pour évaluer des réponses faibles, il est nécessaire d'abord d'obtenir une description précise des précurseurs des cellules T spécifiques de *MAGE-A* chez les individus sains. Dans le travail de Lonchay et al. [Lonchay et al., 2004], la fréquence de cellules T contre *MAGE-A3* 168-176 présenté par HLA-A1(*MAGE-A3.A1*) a été étudiée en détail chez les donneurs sains. La fréquence des précurseurs naïfs dans le sang a été estimée à 4×10^{-7} avec un répertoire de TCR supérieur à 100 clonotypes.

| Tumour Type | No. of Specimens | Number of specimens expressing gene (percentage) | | | | | |
|----------------------------------|---------------------|--|---------|---------|--------|--------|-----|
| | | M1 | M2 | M3 | M4 | M6 | M12 |
| Bladder | 57 | 12(21) | 17(30) | 20(35) | 19(33) | - | - |
| Breast | 28 | 3(11) | 1(4) | 1(4) | 0(0) | - | - |
| Breast | 49 | 15(31) | - | 12(24) | - | - | - |
| Colorectal | 54 | 16(30) | 15(28) | 11(20) | - | - | - |
| Gastric | 68 | 28(41) | 21(31) | 26(38) | - | - | - |
| Gastric | 38 | 11(29) | - | - | - | - | - |
| Glioma | 21 | 8(38) | - | 7(33) | - | - | - |
| Glioma | 14 | 12(86) | - | - | 5(36) | - | - |
| Non-glioma | 14 | 3(21) | - | - | 1(7) | - | - |
| Head and neck - squa- mous | 83 | 27(33) | 34(41) | 36(43) | 22(27) | 35(42) | - |
| Head and neck - non- squamous | 12 | 3(25) | 5(42) | 4(33) | 1(8) | 4(33) | - |
| Hepatocellular | 20 | 16(86) | - | - | - | - | - |
| Leukaemia | | | | | | | |
| T | 21 | 12(57) | - | * | * | * | - |
| B | 8 | 1(13) | - | * | * | * | - |
| Myelomonocytic | 16 | 0(0) | - | * | * | * | - |
| Lung | 53 | 6(11) | 7(13) | 20(38) | 7(13) | - | - |
| Lung | 46 | 16(35) | - | - | - | - | - |
| Lung | 53 | 6(11) | - | 5(9) | 6(11) | 4(13) | - |
| Maxillary | 18 | 9(50) | 8(44) | 9(50) | - | - | - |
| Melanoma - primary | 100 | 16(16) | 41(41) | 36(36) | 11(11) | - | - |
| - metastasis | 145 | 70(48) | 102(70) | 110(76) | 32(22) | - | - |
| Ocular Melanoma- | | | | | | | |
| primary | 27 | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | - | - |
| metastasis | 26 | 1(4) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | - | - |
| Neuroblastoma | 73 | 13(18) | - | 41(73) | - | - | - |
| Oesophagus - primary | 65 | 12(18) | 17(26) | 1(2) | 5(8) | - | - |
| - metastasis | 11 | 5(45) | 2(18) | 0 | 0 | - | - |
| Oesophagus | 42 | 26(62) | 18(43) | 24(57) | - | - | - |
| Oesophagus | 49 | 26(53) | 24(49) | 23(47) | 35(49) | - | - |
| Osteosarcoma | 8 | 5(63) | 6(75) | 5(63) | 1(13) | 5(63) | - |
| Ovary | 58 | 12(21) | 5(9) | 11(19) | 4(7) | - | - |
| Ovary - normal | 16 | 1(6) | 0(0) | 1(6) | 0(0) | - | - |
| - benign | 25 | 21(44) | 1(4) | 0(0) | 0(0) | - | - |
| - malignant | 27 | 15(56) | 1(4) | 0(0) | 1(4) | - | - |
| - metastases | 6 | 2(33) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | - | - |

TAB. 7.1: Les types de tumeurs exprimant les gènes de *MAGE-A*

| Gene | Frequency of expression in metastatic melanoma | Presenting HLA | Peptide sequence | Position in the protein |
|----------|--|----------------|------------------|-------------------------|
| MAGE-A1 | 46% | A2 | KVLEYVIKV | 278-286 |
| | | A3 | SLFRAVITK | 96-104 |
| MAGE-A3 | 74% | A1 | EVDPIGHLY | 168-176 |
| | | DP4 | KKLLTQHFVQENYLEY | 243-258 |
| MAGE-A4 | 28% | A2 | GVYDGREHTV | 230-239 |
| MAGE-A10 | 47% | A2 | GLYDGMEHL | 254-262 |
| MAGE-A10 | 62% | Cw7 | VRIGHLYIL | 170-178 |

TAB. 7.2: Les peptides antigéniques principaux utilisés pour vacciner les patients de mélanome

Cette fréquence était trouvée remarquablement semblable chez différents individus. Chaux et al. ont estimé la fréquence de précurseurs naïfs pour un autre peptide de MAGE-A3 présenté par HLA-A2. Elle était de 5×10^{-7} [Boon et al., 2006].

Les vaccins contenant le peptide MAGE-A3.A1 ont été appliqués dans diverses modalités aux patients atteints de mélanome metastatique. Sur la base de l'analyse de la fréquence des précurseurs naïfs des donneurs sains, Lonchay et al. [Lonchay et al., 2004] ont évalué les réponses CTLs anti-MAGE-A3.A1 des patients atteints de mélanome metastatique qui ont été vaccinés soit avec le peptide sans adjuvant, soit avec un ALVAC (canarypox) virus recombinant portant les séquences codant le peptide MAGE-3.A1, soit avec les cellules dendritiques chargées le peptide. Dans l'essai de vaccination avec le peptide seul, injecté sans adjuvant, seulement un patient parmi les 7 ayant une régression de leur tumeur a eu une réponse CTL. Parmi les patients vaccinés avec ALVAC-MAGE-A3, une réponse CTL a été trouvée chez 3 patients parmi les 4 ayant une régression avec une fréquence de 7×10^{-7} à 3×10^{-3} . Un patient parmi les 11 qui n'ont pas eu de régression tumorale a eu une réponse CTL. Dans la vaccination avec les cellules dendritiques, une réponse CTL a été trouvée chez les trois patients ayant eu une régression avec une fréquence de 3×10^{-6} à 10^{-3} . Aucun patient parmi les trois qui n'ont pas eu de régression n'a eu de réponse CTL. La corrélation entre la régression de tumeur et la réponse CTL est statistiquement significative [Lonchay et al., 2004].

Pour augmenter l'immunogénicité des antigènes, des adjuvants ont été combinés dans les vaccinations à différents antigènes de MAGE-A. Les peptides dérivés de MAGE-A1 et de MAGE-A3 ont été employés seul ou combinés avec différents adjuvants comme le GM-CSF et le QS21. Ils ont été injectés dans ces conditions chez des patients HLA-A1 des tumeurs exprimant les antigènes MAGE-A correspondants. La régression des tumeurs a été observée chez plus de 30% de patients atteints de mélanome après immunisation avec le peptide MAGE-A3 restreint à HLA-A1. Cependant, les CTLs spécifiques de MAGE-A3 n'ont pas été détectés en réponse au vaccin chez ces patients [Boon et al., 2006]. Dans une étude suivante utilisant du GM-CSF suivi de l'administration intradermique des peptides MAGE-A1 et MAGE-A3, une régression partielle des métastases du foie et du poumon a été observée chez un patient souffrant de mélanome après trois mois d'immunisation [Boon et al., 2006].

La possibilité de fournir une aide à la réponse T CD8+ en stimulant les cellules T CD4+ a été aussi explorée. La protéine MAGE-A3 recombinante mélangée avec l'adjuvant AS02B a été administrée à 24 patients. Tous les patients sauf un ont développé une réponse en IgG contre la protéine, indiquant une stimulation des cellules T CD4+ [Marchand et al., 2003]. Quand la protéine a été employée sans adjuvant, seulement 1 patients sur 24 a développé une réponse en IgG contre MAGE-A3 confirmant l'importance de l'adjuvant pour la stimulation in vivo des cellules T CD4+ [Boon et al., 2006]. Des expériences ont été réalisées pour documenter les réponses CD4+ dirigées contre la protéine MAGE-A3. Chez un patient vacciné avec la protéine seule, des cellules T CD4+ anti-MAGE-A3 ont été détectées à une fréquence de 1.5×10^{-5} par rapport à l'ensemble des cellules T CD4+ du sang, représentant au moins une augmentation de 80 fois d'une fréquence avant vaccination [Zhang et al., 2005b]. La plupart de ces cellules T CD4+ ont reconnu le même peptide présenté par HLA-DR1. Les peptides MAGE-A3 restreints aux molécules HLA-DR et DP ont été également combinés avec des DCs. Par exemple, les cellules T CD4+ spécifiques de MAGE-A3 243-258 présenté par HLA-DP4 ont été trouvées avec une fréquence de 7×10^{-4} de cellules T CD4+ de sang après la vaccination avec DCs chargées de ce peptide [Zhang et al., 2005a, Schuler-thurner et al., 2002].

7.1.3 Détection des antigènes MAGE-A et surveillance de la maladie

Etant strictement spécifique des tumeurs, MAGE-A3 a été employé pour détecter la circulation de cellules de mélanome dans le sang périphérique [Gillespie and Coleman, 1999]. Cet essai par PCR utilisant de multiples marqueurs a donné des résultats fiables. Ce test pourrait être employé pour évaluer la progression de tumeur sans procédures diagnostiques invasives. Il pourrait servir au médecin comme aide à la décision et orienter ces choix d'interventions thérapeutiques.

Un test ELISA a été également développé pour mesurer le niveau sérique de la protéine MAGE-A4 chez des patients de cancer du poumon [Gillespie and Coleman, 1999]. Un niveau sensiblement plus haut de la protéine MAGE-A4 a été détecté chez les patients cancéreux par opposition à ceux avec une maladie bénigne pulmonaire ou aucune maladie pulmonaire connue. Des résultats semblables ont été trouvés dans le carcinome de cellules squameuse oro-rhino-pharyngé [Gillespie and Coleman, 1999]. Ces expériences montrent que la protéine MAGE-A4 pourrait être employée comme marqueur unique de tumeur pour certaines conditions cancéreuses.

7.2 Présentation de l'article

Objectif de ce travail L'importance de cellules T CD4+ dans l'induction de l'immunité anti-tumorale est de plus en plus reconnue, ainsi de nombreux peptides de MAGE-A restreints aux molécules HLA II ont été identifiés. Ils sont principalement restreints aux molécules HLA-DR. Un seul peptide restreint aux molécules HLA-DP4 et issus des antigènes MAGE a été identifié. Il s'agit du peptide MAGE-A3 243-258 qui a été inclus dans un vaccin et testé dans des essais cliniques [Schuler-thurner et al., 2002]. La fréquence élevée de HL-DP4 nous a amené à identifier des peptides restreints aux molécules HLA-DP4.

Recherche de peptides possédant le motif de fixation à HLA-DP4 Nous avons récemment montré que les peptides ligands des molécules HLA-DP4 possèdent un motif caractéristique en P1 et P6 [Castelli et al., 2002]. Ces deux positions sont principalement des résidus aromatiques ou aliphatiques. Pour chaque position (P1 à

P9), nous avons quantifié l'effet des substitutions sur la liaison. La somme des effets définit pour chaque séquence un score de liaison. Par comparaison avec les scores de peptides que nous avons identifiés comme étant actifs sur HLA-DP4, un seuil de score d'activité peut être défini. L'ensemble des calculs se fait grâce à un programme de prédiction que nous avons décrit dans le Chapitre 6.

Dans notre étude 9 protéines de la famille de MAGE-A ont été analysées par ce programme de prédiction. Avec un seuil de prédiction de 300nM, 17 peptides ont été sélectionnés.

Synthèse des peptides et tests de liaison Les peptides ont été synthétisés au laboratoire selon la stratégie Fmoc sur un synthétiseur multiple. Les peptides biotinylés sont produits par incorporation d'une biotine sur le N terminal du peptide, encore fixés sur la résine. Chaque peptide est déprotégé par du TFA 95% analysé et purifié. Sa qualité est contrôlée par spectrométrie de masse.

Le principe du test de liaison est celui d'un test ELISA en compétition décrit dans le Chapitre 4. Parmi les 17 peptides sélectionnés, 12 peptides ont été correctement synthétisés et ont été testés pour leur capacité à lier les molécules HLA-DP4. Ils ont tous montré une bonne affinité avec les deux molécules de HLA-DP4 ($IC_{50} < 1000$)(Tab. 1 de l'article). Parmi eux, nous avons sélectionné les 7 meilleurs peptides pour étudier leur capacité à générer des cellules T CD4+ in vitro.

Induction de lignées T CD4+ spécifiques de peptides La technique est décrite en détail dans la partie "matériel et méthodes" de l'article. En bref, l'induction de lymphocytes T humains se fait à partir des PBMC d'individus sains. Le typage de leurs molécules HLA-DP est effectué employant le « Olerup SSP typing kit ». Les cellules adhérentes sont cultivées en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant 5 jours afin de les différencier en cellules dendritiques. Elles sont ensuite rendues matures après une culture de deux jours en présence d'agents de maturation (LPS). Les lymphocytes T CD4+ purifiés à partir des PBMC du même individu sont mis en culture avec les cellules dendritiques matures et préalablement chargées par le mélange de 7 peptides à tester. L'ajout de cytokine permet le maintien de la culture. Après plusieurs restimulations des lymphocytes T CD4+ par des cellules dendritiques chargées par des peptides, la spécificité des cellules est testée par ELISPOT.

Avec cette technique, nous avons étudié leur immunogénicité sur 7 donneurs qui sont DP401, et/ou DP402. Au total, 47 lignées T CD4+ ont été induites par 6 peptides parmi les 7. Le peptide MAGE-A1 90-104 est le plus stimulant (35 lignées) ; Les peptides MAGE A1 268-282 et MAGE-A12 127-142 sont également très immunogènes et induisent respectivement 9 et 12 lignées. (Tab. 2 de l'article). Par conséquent, nous avons décidé de nous concentrer sur la caractérisation des lignées de lymphocytes T spécifiques de ces trois peptides.

Caractérisation de lignées T CD4+ 4 lignées T spécifiques de MAGE-A1 90-104, 2 lignées T de MAGE-A1 128-142, et 2 lignées T spécifiques de MAGE-A12 127-142 ont été caractérisées par les tests de reconnaissance de l'antigène natif. Les lignées T spécifiques de ces trois peptides ont reconnu respectivement la protéine native de MAGE A1 (Fig.1 de l'article) et les lysats de cellules COS-7 transfectées par le plasmide pcDNA1 MAGE-A1 (Fig.1 de l'article) et pcDNA1 MAGE-A12. (Fig.2 de l'article). Par conséquent, nous avons pu montrer que ces trois peptides sont naturellement apprêtés à partir de l'antigène natif. Les tests de doses réponses avec les peptides ont montré que leur présentation se fait de manière efficace (Fig.1. et Fig.2 de l'article). Enfin, nous avons pu montrer que les peptides MAGE-A3 127-141 et MAGE-A11 130-144 stimulent les cellules T spécifiques du peptide MAGE-12 127-142 (Fig.3 de l'article).

Conclusion Dans cette étude, nous avons recherché des épitopes T CD4+ restreints au HLA-DP4 dans la famille d'antigènes MAGE-A. 6 peptides capables d'induire des lymphocytes T CD4+ ont été obtenus, dont 3 peptides sont naturellement apprêtés et présentés. D'après la fréquence calculée de précurseurs T spécifiques (Tab. 3 de l'article), ces 6 peptides immunostimulants peuvent être classés en 3 catégories :

1. MAGE-A1 90-104 était stimulant pour tous les donneurs avec une fréquence de précurseurs de 0,4 à 2,7 par million de cellules T CD4+. Le TCR spécifique de ce peptide est présenté chez tous les donneurs
2. MAGE-A1 268-282 était stimulant pour 2 parmi les 6 donneurs testés avec une fréquence de précurseurs de 0,7 à 3,1 par million de cellules T CD4+. Le TCR spécifique de ce peptide est présente dans un nombre limité de donneurs, mais avec une fréquence de précurseurs comparable avec MAGE-A1 90-104.

3. Les 4 peptides stimulants restants sont regroupés dans troisième catégorie caractérisée par une fréquence faible de précurseurs proche du seuil de détection 0,1 par million de cellules T CD4+. Ils étaient stimulants pour seulement certains donneurs.

Cibotti et al. [Cibotti et al., 1994] ont été montré chez des souris congéniques, les épitopes T sont reconnus soit par un répertoire public de lymphocytes T (c'est-à-dire un répertoire de lymphocytes communs à de nombreux individus), soit par un répertoire privé de lymphocytes T (c'est-à-dire spécifique de chaque individu). Par référence à ce travail, le peptide MAGE-A1 90-104 est un épitope public, le peptide MAGE-A1 268-282 est un épitope privé, et le peptide MAGE-A12 127-141 est un épitope de type public mais avec une fréquence de précurseur faible.

Selective identification of HLA-DP4 binding T cell epitopes encoded by the MAGE-A gene family

Xiao-Fei Wang · William M. Cohen · Florence A. Castelli · Christine Almunia · Bernard Lethé · Sandra Pouvelle-Moratille · Gaetan Munier · Dominique Charron · André Ménéz · Hassan M. Zarour · Pierre van der Bruggen · Marc Busson · Bernard Maillère

Received: 9 June 2006 / Accepted: 22 August 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Because of the high frequency of HLA-DP4 in the Caucasian population, we have selectively delineated HLA-DP4 restricted T cell epitopes in the MAGE-A tumor antigens. We identified 12 good binders to HLA-DP4 and investigated the capacity of the seven best binders to induce in vitro specific CD4+ T cell lines from HLA-DP4 healthy donors. We found that the MAGE-A1 90–104 peptide exhibited a high and constant frequency of CD4+ T cell precursors in all the six tested donors. The MAGE-A1 268–282 peptide was found immunogenic in only two donors but with a high precursor frequency. The MAGE-A12 127–141 peptide was T cell stimulating in six different donors and induced fewer T cell lines. The peptide-specific T cell lines were stimulated by DC loaded

with the lysates of cells transfected with MAGE-A1 or MAGE-A12, or loaded with the recombinant protein. We also show that the immunoreactivity of CD4+ T cell epitopes restricted to the same HLA II molecule may vary from one individual to another, as a result of inter-individual variations in the CD4+ T cell repertoire.

Keywords HLA-DP4 · Antigens/peptides/epitopes · CD4+ T lymphocyte · Tumor · MAGE

Introduction

Immune response induced by vaccination against tumor cells remains weak and often insufficient to cure the disease [21]. Tumor regressions have been observed in clinical studies but in most cases it has not been clearly demonstrated that these were due to the immune responses induced by the vaccine [19, 21]. CTL response to tumor antigens has been widely investigated using various reliable tools and methods to enumerate and characterize tumor-specific CD8+ T cells [6, 31, 32]. Multiple CD4+ T cell epitopes from various relevant antigens have been identified [5, 8, 11, 16, 18, 23, 34–36, 38, 39]. Most of these epitopes are restricted to the HLA-DR molecules [5, 8, 11, 16, 18, 34–36, 39], which are highly polymorphic. In contrast to HLA-A molecules, no preponderant HLA-DR molecule exists, each molecule being present at relatively low frequency in the population [4]. Some T cell epitopes derived from tumor antigen sequences are able to bind multiple HLA-DR molecules and therefore could facilitate clinical investigations [11, 16, 18, 36, 39]. Their different affinities and binding registers for the HLA-DR

X.-F. Wang · W. M. Cohen · F. A. Castelli · C. Almunia · S. Pouvelle-Moratille · G. Munier · A. Ménéz · B. Maillère (✉)
Protein Engineering and Research Department,
CEA-Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France
e-mail: bernard.maillere@cea.fr

B. Lethé · P. van der Bruggen
Ludwig Institute for Cancer Research and Cellular
Genetics Unit, Université Catholique de Louvain,
74 avenue Hippocrate, UCL 74.59,
1200 Brussels, Belgium

D. Charron · M. Busson
INSERM U662, Hôpital St Louis,
75475 Paris cedex 10, France

H. M. Zarour
Department of Medicine and Division of Hematology/
Oncology, Department of Immunology,
University of Pittsburgh School of Medicine,
Pittsburgh, PA 15213, France

molecules could, however, bias the understanding of inter-individual T cell responses.

In contrast to HLA-DR, HLA-DP4 molecules are advantageously present at a high frequency worldwide [4]. HLA-DPA1*0103/DPB1*0401 (DP401) and HLA-DPA1*0103/DPB1*0402 (DP402) differ by only three amino acids and have a very similar binding motif [3]. In the Caucasian population, HLA-DP401 and HLA-DP402 gene frequency is approximately 40 and 11%, respectively. Together, they are found in approximately 76% of individuals. This high frequency allows easy recruitment of a population of cancer patients and healthy donors, who share a common HLA II molecule. T cell epitopes restricted to HLA-DP4 molecules facilitate the monitoring of the frequency and of the predominance of antigen-specific CD4⁺ responses in cancer patients in a comprehensive way [1, 22, 40]. They also allow the monitoring of vaccine-induced CD4⁺ T cell responses raised against defined tumor antigens. Nevertheless, HLA-DP4 restricted T cell epitopes have been found in MAGE-A3 [23] and NY-ESO-1 tumor antigens only [18, 38]. Melanoma patients have been vaccinated with dendritic cells loaded with the HLA-DP4-restricted peptide MAGE-A3 [22]. Recently, functional HLA-DP4 multimers were produced with the MAGE-A3 peptide and have been used to evaluate the frequencies of peptide-specific T cells induced by vaccination [40]. A limited number of HLA-DP4 restricted CD4⁺ T cell epitopes are therefore available to monitor CD4⁺ T cell responses specific for tumor antigens.

In this paper, we have tackled the entire MAGE-A family and report three newly discovered epitopes in MAGE-A1 and MAGE-A12. Our motivation of analyzing MAGE-A proteins comes from its broad tumor-specificity. The MAGE-A family belongs to the class of tumor-specific antigens, which are silent in normal tissue, testicular germ cells excepted [13, 31]. These antigens are encoded by 12 closely related genes and include the first identified tumor antigen (MAGE-A1) [32]. Initially found in melanoma cells, MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6 and -A10 are also expressed in various tumors, while most of the other MAGE-A proteins have also been detected in different malignant cells [13, 31]. As shown by the multiple CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes identified in MAGE-A proteins [5, 6, 8, 16, 20, 23, 32, 38, 39], they appear to be a favored target of cellular response and are used in multiple vaccination trials [1, 17, 19, 22, 41]. By combining peptide-binding prediction that we have recently set up [10], peptide-binding assays and CD4⁺ T cell priming experiments, we successfully found new HLA-DP4-restricted T cell epitopes in the MAGE-A antigens.

Materials and methods

Peptides and antigens

Peptides were synthesized by using standard Fmoc chemistry on a multiple peptide synthesizer APEX 396 (Advanced Chemtech, Louisville, KY) as described previously [3]. The MAGE-A1 protein was produced after the infection of insect cells by a recombinant baculovirus. The protein has six histidine residues at the C-terminal for the purification by ion metal affinity chromatography. Bv-PLA2 was produced in *E. coli* and purified as described previously [2].

HLA-DP4 specific peptide-binding assays

HLA-DP4 molecules were purified by affinity chromatography using B7/21 Mab coupled to Protein A Sepharose CL 4B gel (Pharmacia Biotech) as previously described [3]. Binding assays were performed by competitive ELISA as described previously [3]. Data were expressed as the peptide concentration that prevented binding of 50% of the labeled peptide (IC₅₀). IC₅₀ values of the Oxy 271–287 peptide served as a reference in each experiment.

Blood samples and HLA-DP genotyping

Blood cells were collected at the Etablissement Français du Sang (EFS, Rungis, France) as buffy-coat preparations from anonymous healthy donors after informed consent and following EFS guidelines. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hyperpaque gradients (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Genotyping was performed using the Olerup SSP DPB1 typing kit (Olerup SSP AB, Saltsjobaden, Sweden) according to the manufacturer. HLA-DPB genotyping results were the following: donor 78 (DPB1*0402, DPB1*1301), donor 121 (DPB1*0402, DPB1*401), donor 122 (DPB1*0401), donor 126 (DPB1*0401), donor 129 (DPB1*0402, DPB1*402), donor 156 (DPB1*0401), donor 158 (DPB1*0402), donor 164 (DPB1*0401, DPB1*1101), donor 172 (DPB1*0401, DPB1*301) and donor 177 (DPB1*0401, DPB1*301).

Induction of CD4⁺ T cells with peptides

Immature and mature DC were generated from plastic-adherent PBMC by a 5-day culture in AIM-V medium supplemented with 1,000 units/ml of rh-GmCSF (R&D System, Lille, France) and 1,000 units/ml of rh-IL-4 (R&D Systems). LPS (Sigma) (1 µg/ml) was used as

maturation agent. CD4⁺ T lymphocytes were isolated from non-adherent PBMC by positive selection using an anti-CD4 monoclonal antibody coupled to magnetic microbeads (Miltenyi Biotech, Paris, France). Mature DC were incubated at 37°C, 5% CO₂, for 4 h in IMDM medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 24 mM glutamine, 55 mM asparagine, 150 mM arginine (all amino acids from Sigma), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Invitrogen), and 10% human serum (hereafter referred to as complete IMDM medium) with a solution of the MAGE-A peptide mixture (MAGE-A1 90–104, MAGE-A1 268–282, MAGE-A2 111–125, MAGE-A2 219–233, MAGE-A9 68–82, MAGE-A9 153–167, MAGE-A12 127–141)(10 µg/ml of each peptide). Pulsed mature DC cells (10⁴ per round-bottom microwell) were added to 10⁵ autologous CD4⁺ lymphocytes in 200 µl complete IMDM with 1,000 U/ml of IL-6 (R&D systems, Abingdon, UK) and 10 ng/ml of IL-12 (R&D systems). The CD4⁺ T lymphocytes were re-stimulated on days 7, 14 and 21 with autologous DC freshly loaded with the MAGE-A peptide mixture, and were grown in complete IMDM medium supplemented with 10 U/ml of IL-2 (R&D systems) and 5 ng/ml of IL-7 (R&D systems). The stimulated CD4⁺ T cells were analyzed for specificity in enzyme-linked immunospot (ELISpot) assays at least 6 days after the last stimulation.

Transfection of COS-7 cells and preparation of cell lysates

cDNA for MAGE-A1 and MAGE-A12 was cloned into the vector pcDNA1/Amp. COS-7 cells were plated in 6-well plates (5 × 10⁵ cells/well) 18 h before transfection. The cells were transiently transfected with 4 µg/well of pcDNA1-MAGE1 or pcDNA1-MAGE12 plasmid using Lipofectamine2000 (Invitrogen). Forty-eight hours later, transfection efficacy was assessed by flow cytometry. Cells were harvested and lysed in AIM V medium at a cellular concentration of 10⁷ cells/ml by five rapid freeze-thaw cycles. Cellular lysates were centrifuged at 14,000 t/min for 10 min. Supernatants were recovered and stocked at −20°C.

IFN-γ ELISpot assays

Multiscreen HA plates (Millipore, St Quentin en Yvelines, France) were coated with 1 µg/ml of mAb anti-human IFN-γ (1-D1K, Mabtech, Stockholm, Sweden) in PBS (Invitrogen) for 1 h at 37°C and saturated with complete IMDM. APC were autologous immature DC or HLA-DP402 transfected L cells (L-DP4 cells).

MAGE1 protein (1 µM) and cell lysates (300 µl produced with 3 × 10⁶ cells) were incubated for 4 h at 37°C with immature DC (10⁶/ml) in the presence of 1 µg/ml of LPS. DC were subsequently washed before use. Peptides (10 µg/ml) were directly added to the Multiscreen plates. Immature DC (2 × 10⁴/well) or murine L cells transfected with the HLA-DP402 gene (L-DP4)(3 × 10⁴/well) were distributed in Multiscreen plates together with 5 × 10³ T cells. After overnight incubation at 37°C, captured IFN-γ was detected by subsequent addition of biotinylated MAb anti-hIFNγ (7-B6-1; Mabtech) (0.25 µg/ml), Extravidin-phosphatase (Sigma) and NBT/BCIP (Sigma). Spot numbers were automatically determined by the AID ELISpot Reader System (AID, Strassberg, Germany). For statistical evaluation, a *t*-test was used. Values of *P* < 0.05 were considered significant.

Results

Twelve good binders to HLA-DP4 molecules were identified in the MAGE-A antigens

We have recently described a new prediction method of binding to HLA-DP4 based on quantitative binding matrices [10]. The prediction matrices were built with the binding data obtained with analogs of a good binder to HLA-DP4, substituted by various amino acids at positions accommodated by the pockets 1, 4, 6 and 9 of the peptide-binding site [3]. To predict the peptide binders to HLA-DP4, we assigned to all 9-mer of a sequence, a predicted IC₅₀ by addition of the values in the P1, P4 P6 and P9 pockets for each corresponding amino acid of the peptide. This method was successfully used to identify HLA-DP4 restricted peptides in the whole genome of HIV [10]. In the present paper, we applied the binding prediction to nine proteins of the MAGE-A tumor antigen family, which are expressed in melanoma cells [25]. Seventeen peptides exhibited a predicted IC₅₀ below 500 nM for HLA-DP401 molecules, but only 12 of them were successfully synthesized (Table 1). Their binding to HLA-DP401 and HLA-DP402 molecules was assessed by ELISA. On the basis of an activity threshold of 1,000 nM [26], they were all found to be good binders for both HLA-DP4 molecules (Table 1). Two and three active peptides derived from MAGE-A1 and MAGE-A2, respectively, displayed very low IC₅₀ values. Only one peptide was active in the MAGE-A3, MAGE-A4 and MAGE-A12 proteins, the MAGE-A3 peptide corresponding to the HLA-DP4 restricted peptide described previously [23]. Finally, two active

Table 1 Binding capacity of MAGE-A peptides to HLA DP4 molecules

| Peptide | Sequence | | | | | | | | | | | | | | | IC ₅₀ (DP401) | | IC ₅₀ (DP402) | | | | | |
|------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|--|-------|------|-------|
| | 1 | | | | | 4 | | | | | 6 | | | | | 9 | | | | | Pred. | Obs. | Pred. |
| MAGE-A1 90–104 | T | S | C | I | L | E | S | L | F | R | A | V | I | T | K | 120 | 155 (±7) | 120 | 100 (±0) | | | | |
| MAGE-A1 268–282 | P | R | A | L | A | E | T | S | Y | V | K | V | L | E | Y | 120 | 13 (±1) | 182 | 16 (±1) | | | | |
| MAGE-A2 111–125 | R | K | M | V | E | L | V | H | F | L | L | L | K | Y | R | 155 | 6 (±1) | 85 | 4 (±1) | | | | |
| MAGE-A2 143–157 | C | Q | D | F | F | P | V | I | F | S | K | A | S | E | Y | 56 | 335 (±7) | 56 | 50 (±5) | | | | |
| MAGE-A2 219–233 | E | K | I | W | E | E | L | S | M | L | E | V | F | E | G | 158 | 43 (±14) | 40 | 37 (±4) | | | | |
| MAGE-A3 247–261 | T | Q | H | F | V | Q | E | N | Y | L | E | Y | R | Q | V | 79 | 265 (±4) | 1,348 | 400 (±15) | | | | |
| MAGE-A4 248–262 | T | Q | D | W | V | Q | E | N | Y | L | E | Y | R | Q | V | 79 | 200 (±0) | 1,348 | 320 (±6) | | | | |
| MAGE-A9 68–82 | S | I | S | V | Y | Y | T | L | W | S | Q | F | D | E | G | 219 | 15 (±4) | 602 | 30 (±11) | | | | |
| MAGE-A9 153–167 | A | S | E | F | M | Q | V | I | F | G | T | D | V | K | E | 100 | 40 (±11) | 112 | 21 (±7) | | | | |
| MAGE-A10 244–258 | E | V | I | W | E | A | L | N | M | M | G | L | Y | D | G | 79 | 245 (±7) | 20 | 64 (±1) | | | | |
| MAGE-A10 303–317 | H | A | E | I | R | K | M | S | L | L | K | F | L | A | K | 363 | 730 (±14) | 1,000 | 175 (±14) | | | | |
| MAGE-A12 127–141 | R | E | P | F | T | K | A | E | M | L | G | S | V | I | R | 363 | 120 (±11) | 50 | 47 (±4) | | | | |

Peptides were investigated for their capacity to bind HLA-DP401 and HLA-DP402 by competitive ELISA. Predicted (Pred.) and observed (Obs.) IC₅₀ are expressed in nM. IC₅₀ means and SD are calculated from two to three independent experiments. The reference peptide used in these assays is Oxy 271–287 (EKKYFAATQFEPLAARL). Its IC₅₀ was 8 and 6 nM for HLA-DP401 and HLA-DP402 molecules, respectively. The P1, P4, P6 and P9 positions are indicated in bold

peptides were found in the MAGE-A9 and MAGE-A10 proteins. As a result, besides the MAGE-A3 peptide, we found 11 new peptide sequences, which are able to bind to HLA-DP4 molecules. The seven best peptides (MAGE-A1 90–104, MAGE-A1 268–282, MAGE-A2 111–125, MAGE-A2 219–233, MAGE-A9 68–82, MAGE-A9 153–167, MAGE-A12 127–141) were retained for T cell priming experiments.

Six HLA-DP4 restricted MAGE-A peptides are able to prime in vitro human CD4⁺ T lymphocytes

The CD4⁺ T cell priming ability of the peptides were investigated based on previously published protocols [8, 35]. Healthy T CD4⁺ cells were harvested from ten different HLA-DP4⁺ normal donors and were stimulated by mature DCs loaded with a mixture of the peptides or with the individual peptides. Specificity of the growing T cell lines was assessed by IFN- γ Elispot using L cells transfected by HLA-DP4 molecules as APC. As shown in Table 2, 28 specific T cell lines were derived from four different healthy donors. Their activation by the peptides was HLA-DP4 restricted, as the omission of the HLA-DP4 transfected L cells completely abolished the T cell activation. Assays performed with individual peptides showed that most of the T cell lines were specific for only one peptide, namely MAGE-A1 90–104. Only four T cell lines were specific for other two peptides (MAGE-A2 111–125 and MAGE-A12 127–141). We also derived peptide specific T cell lines from six other healthy donors. Together, we obtained 35 HLA-DP4 restricted T cell lines specific for MAGE-A1 90–104, 12 for MAGE-A1

268–282, 9 for MAGE-A12 127–141, one for MAGE-A2 111–125, MAGE-A9 153–167 and MAGE-A9 68–82 but none for MAGE-A2 219–233. Based on these results, we evaluated the frequency of peptide-specific CD4⁺ T cell precursors as proposed previously [7, 30] (Table 3). In the conditions of cell distribution we used (10⁵ CD4⁺ T lymphocytes per well), a minimum of 70% of the wells did not contain T cells specific for MAGE-A peptides, suggesting that no specific T cells precursors were seeded in these wells during the distribution of the CD4⁺ T cells. As the distribution of cells followed a Poisson distribution, where most of the wells were free of specific T cells, wells that contained specific T cells mostly derived from only one precursor. Accordingly, we observed that the T cell lines were mainly specific for one peptide only. The precursor frequency was estimated on the basis of a Poisson distribution (see legend of Table 3) [7, 30]. The MAGE-A1 90–104 peptide was immunogenic for all the donors and its CD4⁺ precursor frequency is approximately of 10⁻⁶ (Table 3). A lower number of responders or a lower frequency of precursors was observed for the other peptides (Table 3). As a result, we demonstrated that six out of the seven peptides we investigated for T cell stimulating activity were able to prime peptide-specific and HLA-DP4 restricted human T cell lines.

The T cell lines specific for MAGE-A1 90–104, MAGE-A1 268–282 and MAGE-A12 127–142 are specific for the native antigen

We analyzed the specificity of four T cell lines from two different healthy donors, which were specific for

Table 2 Peptide specificity of T cell lines induced by a mixture of seven HLA-DP4 restricted peptides

| IFN- γ spots/5,000 cells | | | | | | | |
|---------------------------------|--------------|----------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------|
| Donor | T cell lines | Control | Peptide mixture | MAGE-A2 111–125 | MAGE-A1 90–104 | MAGE-A12 127–141 | No APC |
| 78 | 78–13 | 5 (\pm 1) | 98 (\pm 4) | 49 (\pm 3) | 92 (\pm 9) | 10 (\pm 1) | 6 (\pm 1) |
| | 78–22 | 27 (\pm 4) | 162 (\pm 13) | 65 (\pm 6) | 177 (\pm 1) | 35 (\pm 2) | 10 (\pm 3) |
| | 78–32 | 1 (\pm 1) | 117 (\pm 11) | 0 (\pm 0) | 185 (\pm 11) | 0 (\pm 0) | 4 (\pm 1) |
| 121 | 121–6 | 2 (\pm 1) | 92 (\pm 13) | 9 (\pm 4) | 123 (\pm 15) | 3 (\pm 0) | 0 (\pm 0) |
| | 121–9 | 3 (\pm 1) | 392 (\pm 19) | 2 (0) | 366 (\pm 8) | 4 (\pm 1) | 0 (\pm 0) |
| | 121–19 | 4 (\pm 3) | 216 (\pm 1) | 5 (\pm 2) | 153 (\pm 6) | 280 (\pm 20) | 0 (\pm 0) |
| | 121–21 | 2 (\pm 1) | 106 (\pm 21) | 4 (\pm 6) | 147 (\pm 17) | 1 (\pm 1) | 0 (\pm 0) |
| | 121–24 | 19 (\pm 0) | 140 (\pm 3) | 23 (\pm 6) | 208 (\pm 3) | 15 (\pm 13) | 1 (\pm 1) |
| | 121–30 | 5 (\pm 0) | 171 (\pm 1) | 4 (\pm 1) | 329 (\pm 1) | 7 (\pm 4) | 2 (\pm 1) |
| | 121–34 | 5 (\pm 5) | 86 (\pm 6) | 23 (\pm 9) | 83 (\pm 1) | 4 (\pm 1) | 1 (\pm 1) |
| | 121–38 | 18 (\pm 10) | 108 (\pm 1) | 15 (\pm 2) | 104 (\pm 1) | 8 (\pm 3) | 0 (\pm 3) |
| | 121–40 | 1 (\pm 1) | 208 (\pm 0) | 4 (\pm 0) | 250 (\pm 9) | 6 (\pm 4) | 0 (\pm 0) |
| | 121–44 | 5 (\pm 0) | 102 (\pm 3) | 15 (\pm 5) | 98 (\pm 8) | 110 (\pm 14) | 1 (\pm 1) |
| | 121–48 | 6 (\pm 0) | 225 (\pm 16) | 6 (\pm 2) | 253 (\pm 1) | 8 (\pm 7) | 0 (\pm 0) |
| | 121–49 | 2 (\pm 1) | 87 (\pm 9) | 5 (\pm 1) | 122 (\pm 8) | 3 (\pm 4) | 0 (\pm 0) |
| 122 | 122–12 | 9 (\pm 4) | 173 (\pm 18) | 2 (\pm 10) | 178 (\pm 20) | 12 (\pm 6) | 4 (\pm 1) |
| | 122–26 | 1 (\pm 1) | 120 (\pm 0) | 11 (\pm 1) | 110 (\pm 11) | 8 (\pm 4) | 3 (\pm 0) |
| | 122–27 | 5 (\pm 7) | 97 (\pm 1) | 4 (\pm 1) | 105 (\pm 7) | 1 (\pm 1) | 0 (\pm 0) |
| | 122–28 | 1 (\pm 1) | 101 (\pm 8) | 4 (\pm 4) | 110 (\pm 7) | 0 (\pm 0) | 0 (\pm 0) |
| | 122–29 | 3 (\pm 2) | 185 (\pm 3) | 7 (\pm 1) | 196 (\pm 15) | 2 (\pm 1) | 1 (\pm 0) |
| 129 | 129–7 | 5 (\pm 0) | 197 (\pm 20) | 3 (\pm 3) | 1 (\pm 1) | 307 (\pm 17) | 1 (\pm 1) |
| | 129–12 | 1 (\pm 1) | 110 (\pm 10) | 2 (\pm 1) | 112 (\pm 13) | 2 (\pm 1) | 1 (\pm 1) |
| | 129–14 | 0 (\pm 0) | 93 (\pm 10) | 1 (\pm 0) | 97 (\pm 19) | 3 (\pm 2) | 1 (\pm 1) |
| | 129–24 | 2 (\pm 3) | 106 (\pm 6) | 21 (\pm 9) | 120 (\pm 4) | 4 (\pm 2) | 0 (\pm 0) |
| | 129–30 | 0 (\pm 0) | 92 (\pm 3) | 0 (\pm 1) | 86 (\pm 17) | 6 (\pm 1) | 1 (\pm 1) |
| | 129–34 | 3 (\pm 3) | 122 (\pm 6) | 115 (\pm 5) | 5 (\pm 3) | 3 (\pm 0) | 2 (\pm 1) |
| | 129–37 | 4 (\pm 1) | 82 (\pm 4) | 1 (\pm 1) | 91 (\pm 0) | 3 (\pm 0) | 0 (\pm 0) |
| | 129–39 | 7 (\pm 2) | 84 (\pm 4) | 4 (\pm 4) | 93 (\pm 18) | 5 (\pm 1) | 1 (\pm 1) |

CD4⁺ T cell lines from four tumor-free donors (78, 121, 122 and 129) were obtained after 3 weekly stimulations by autologous mature dendritic cells loaded with a mixture of seven selected peptides (MAGE-A1 90–104, MAGE-A1 268–282, MAGE-A2 111–125, MAGE-A2 219–233, MAGE-A9 68–82, MAGE-A9 153–167, MAGE-A12 127–141). The specificity of the T cell lines was assessed by IFN- γ Elispot. L-DP4 were used as APC. The negative control corresponds to the wells containing no peptides. The positive values are at least three times higher than the negative control with a minimal number of 30 spots (bold)

MAGE-A1 90–104 (Fig. 1). These CD4⁺ T cell lines specifically recognized MAGE-A1 90–104 presented by autologous DC and reacted to autologous DC previously loaded with the recombinant MAGE-A1 protein (Fig. 1 left panels). They were not, however, stimulated by unloaded DC and by DC fed with the recombinant bv-PLA2 (control protein), which was previously used to investigate the T cell response of mice [2] and patients allergic to bee venom [29]. Moreover, T cell lines were activated by DC fed with a lysate of COS-7 cells transfected with the MAGE-A1 gene, but not by DC fed with a lysate of untransfected COS-7 cells or pulsed with a lysate of COS-7 cells transfected with the MAGE-A12 gene. Expression of transfected MAGE-A1 in Cos-7 cells was at a similar level to its natural expression in melanoma cells (Data not shown). Peptide concentration response of three cell lines demonstrated their efficient stimulation by the MAGE-A1 90–104 peptide (Fig. 1, right panels). We also characterized two T cell lines which were specifically stimu-

lated by MAGE-A1 268–282 presented by L-DP4 cells or by autologous DC (Fig. 2). In contrast to the control protein, the recombinant MAGE-A1 protein stimulated the two T cell lines after being captured by autologous DC, while unloaded DC served as baseline control (Fig. 2, left panels). The T cell lines were also activated by a lysate of COS-7 cells transfected with the MAGE-A1 gene but not by a lysate of untransfected COS-7 cells. The peptide concentration response of the T cell lines showed that the activation occurred at a high peptide concentration only, suggesting that the corresponding Tcr had a moderate affinity for the MAGE-A1 268–282 peptide (Fig. 2, right panels). Two T cell lines specific for the MAGE-A12 127–141 peptide exhibited an intense peptide response when L-DP4 was used as APC, although it was of lower intensity on autologous DC (Fig. 3). A significant response was observed for both T cell lines when DC were fed with a lysate of COS-7 cells transfected with the MAGE-A12 gene. It was equivalent to that

Table 3 Estimate of the number of CD4⁺ T cell precursors specific for the HLA-DP4 restricted MAGE-A peptides

| Peptides | Positive Donors | CD4 ⁺ precursor frequency | | |
|------------------|-----------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|
| | | Min. | Max. | Mean |
| MAGE-A1 90–104 | 6/6 | 4.1×10^{-7} | 2.7×10^{-6} | 1.4×10^{-6} |
| MAGE-A1 268–282 | 2/6 | 6.9×10^{-7} | 3.1×10^{-6} | 1.9×10^{-6} |
| MAGE-A12 127–141 | 6/10 | 1.7×10^{-7} | 6.9×10^{-7} | 3.1×10^{-7} |
| MAGE-A2 111–125 | 1/5 | – | – | 2.5×10^{-7} |
| MAGE-A9 68–82 | 1/5 | – | – | 1.7×10^{-7} |
| MAGE-A9 153–167 | 1/5 | – | – | 1.7×10^{-7} |

CD4⁺ T cell precursor frequency was estimated using the Poisson distribution according to the following formula: frequency = $-\text{Ln}[(\text{number of negative wells}/\text{total number of wells tested})]/(\text{number of CD4}^+$ T cells seeded per well). Minima, maxima and means are given for the positive donors only. The number of CD4⁺ T cells seeded per well were 100,000 cells for all the donors. As an example, the calculations of the precursor frequency for the peptide MAGE-A1 90–104 based on the data presented in Table 1 were the following: donor 78, 3 positive wells for 40 wells seeded (the frequency was $-\text{Ln}(3/40)/10^5 = 7.8 \times 10^{-7}$); donor 121, 12 positive wells for 50 wells seeded (2.7×10^{-6}); donor 122, 5 positive wells for 30 wells seeded (1.8×10^{-6}) and donor 129, 6 positive wells for 40 wells seeded (1.6×10^{-6}). For the peptide MAGE-A12 127–141: donor 121, 2 positive wells for 50 wells seeded (4.1×10^{-7}); donor 129, 1 positive well for 40 wells seeded (2.5×10^{-7})

provoked by the MAGE-A12 127–141 peptide. In contrast, the lysate of untransfected COS-7 cells exhibited a lower, if any, T cell stimulating capacity. The low number of harvested T cells did not allow us to evaluate the peptide concentration response. We concluded from these experiments that the peptides MAGE-A1 90–104, MAGE-A1 268–282 and MAGE-A12 127–141 elicited specific T cell lines, which were also specific for the native protein presented by autologous DC.

MAGE-A12 127–141 specific T cell lines recognize other MAGE-A sequences besides the native one

Among immunogenic peptides we identified in this study, MAGE-A2 111–125 and MAGE-A12 127–141 exhibited a good level of conservation with homologous peptides encoded by the other MAGE-A genes. We therefore investigated the peptide-binding activity (Table 4) and T cell reactivity of corresponding analogs (Fig. 4). Two natural analogs of MAGE-A2 111–125, namely MAGE 3 111–125 and MAGE 12 111–125, bound well to both HLA-DP4 molecules (Table 4). However, they were not antigenic for the MAGE-A2 111–125 specific T cell line 129.34 (Fig. 4). Among the natural analogs of MAGE-A12 127–141, MAGE-A11 130–144 bound to both HLA-DP4 molecules, while the six other bound to HLA-DP402 only (Table 4).

MAGE-A11 130–144 stimulated three T cell lines specific for MAGE-A12 127–141, while MAGE-A3 127–141 stimulated the 172.10 and 177.16 T cell lines only (Fig. 4).

Discussion

The high frequency of HLA-DP4 in the population facilitates the recruitment of patients for clinical trials and the development of new approaches of cancer immunotherapy. As an example, HLA-DP4 restricted T cell epitopes discovered in MAGE-A3 [23] and NY-ESO-1 tumor antigens [18, 38] have been proposed as vaccine candidates [22, 24, 37] and immunomonitoring reagents [1, 40]. However, these epitopes were discovered by chance, since no reliable methods existed to selectively identify HLA-DP4 restricted T cell epitopes. We have therefore recently set up a binding prediction method to selectively identify HLA-DP4-restricted T cell epitopes in any kind of antigens [10]. Considering the interest of targeting the MAGE-A family for cancer immunotherapy, this approach has been applied to this tumor-specific gene family. We identified 12 peptides, which were good binders to HLA-DP401, ranked six different peptides for their T cell stimulating properties, and identified two peptides from MAGE-A1 and one peptide from MAGE-A12, which were demonstrated to be naturally processed epitopes of the native antigens.

Based on the frequency of responders and on the frequency of peptide-specific precursors, the six T cell stimulating peptides we identified may be classified into three different categories. The peptide MAGE-A1 90–104 was stimulating for all six healthy donors tested. The frequency of precursors ranged from 0.4 to 2.7 per million CD4⁺ T cells (Table 3). Tcr capable of reacting with this peptide were present in all the individuals and at a high frequency in comparison to previous studies [12, 17, 30, 40]. In particular, its precursor frequency was similar to that of the MAGE-A3/DP4 epitope found in melanoma patients before vaccination [40]. The second category is described by the peptide MAGE-A1 268–282. T cell reactivity against this peptide was found in two of the six donors at a frequency of precursors of 0.7 to 3.1 per million CD4⁺ T cells (Table 3). Therefore, it was present probably in a limited number of the donors but at a comparable precursor frequency to MAGE-A1 90–104. In congenic mice, it has been shown that a T cell response raised against an antigen involves a “public” V β repertoire found in all animals and a “private” one, which is specific to each individual [9]. According to these experiments

Fig. 1 Characterization of MAGE-A1 90–104 specific T cell lines. *Left panels* MAGE-A1 90–104 specific T cell lines (156.46, 158.28, 158.48 and 156.50) were incubated (5×10^3 cells/well) in an Elispot assay using L-DP4 or immature DC as APC (2×10^4 /well). DCs were previously loaded with a lysate of transfected or untransfected COS-7 cells or proteins (1 μ M). *Right panels* T cell lines were incubated in the presence of L-DP4 cells (3×10^4 /well) with a concentration range of the peptide (*closed squares*) or without any peptide (*open circle*). Each value represents the average spot number of the duplicates. Double asterisk and asterisk indicate $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively

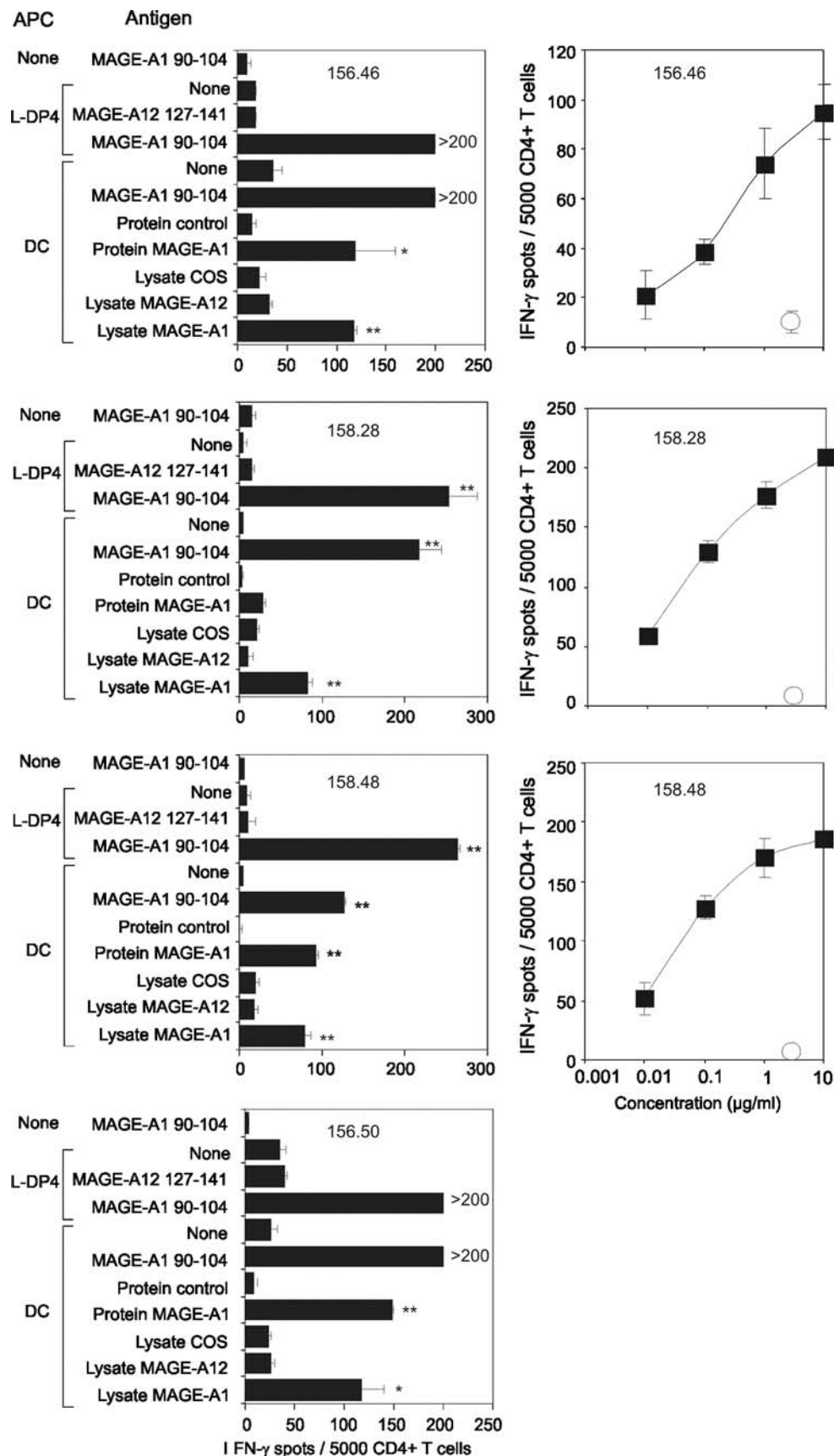
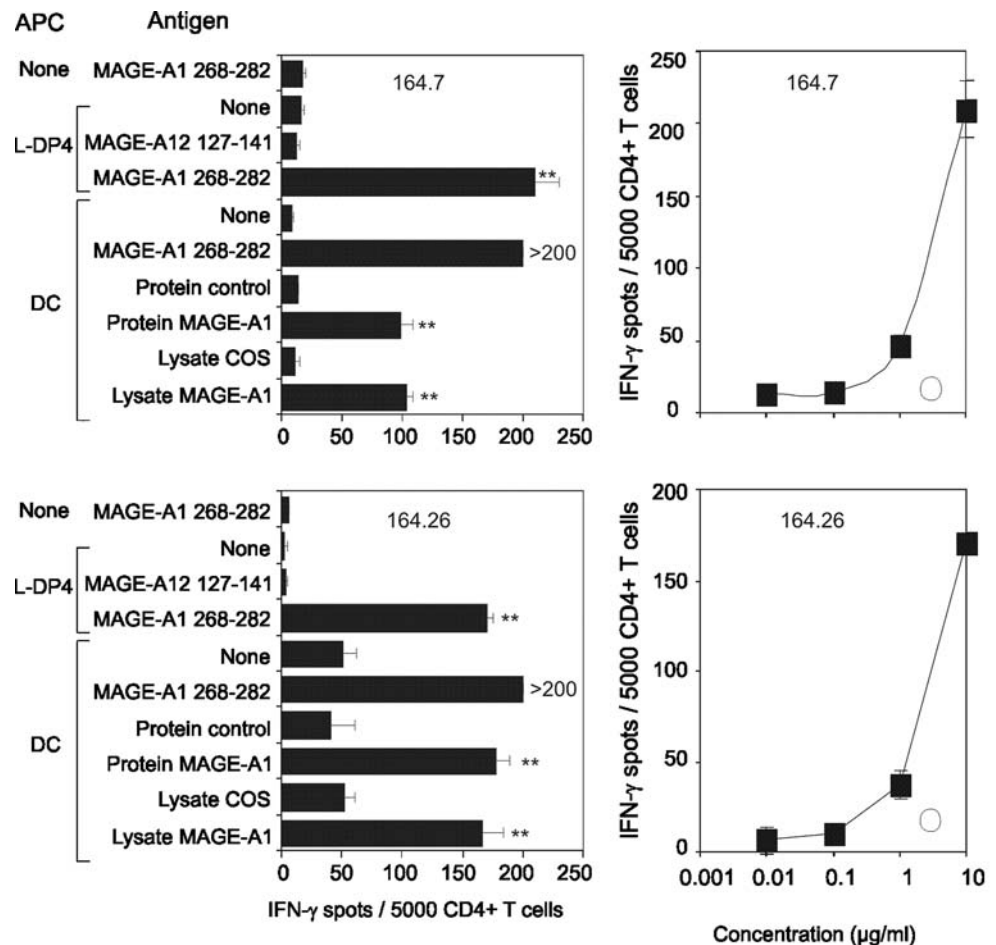


Fig. 2 Characterization of MAGE-A1 268–282 specific T cell lines. Two MAGE-A1 268–282 specific T cell lines (164.7 and 164.28) were submitted to an IFN- γ EliSpot assay as described for Fig. 1



MAGE-A1 268–282 seemed to be recognized by Tcr belonging to the private repertoire, while MAGE-A1 90–104 recruited Tcr from the public repertoire. The third category is composed by the peptides that elicited a T cell response in some donors only because of their low precursor frequencies. They are close to the detection threshold of the method (0.1 per million CD4+ T cells) (Table 3). This category comprises the MAGE-A2 111–125, MAGE-A9 68–82, MAGE-A9 153–167 and MAGE-A12 127–141 peptides. The latter was active in six out of ten donors tested and its precursor frequency ranged from 0.2 to 0.7 per million CD4+ T cells. Interestingly, we observed that the most T cell stimulating peptides are not the best binders to HLA-DP4. MAGE-A1 90–104 was less efficient to bind HLA-DP4 molecules than MAGE-A2 111–125, MAGE-A1 268–282 and MAGE-A9 153–167. In many studies [14, 27], including ours [28], affinity for MHC molecules appeared to be a limiting factor for foreign antigens to elicit CD4+ T cell response. In this paper, we compared T cell stimulating efficiency of peptides that displayed a good affinity and did not submit low binders to T cell stimulation assays. Our data strongly

suggest that good binders recruit CD4+ T cells at different levels of efficacy and that in these conditions affinity does not constitute a limiting factor. We also showed that the capacity of peptides to stimulate T cells could vary greatly from one individual to another, even in HLA class II controlled conditions. Thus, this sustains the interest in investigating the T cell response in multiple donors.

Two of the peptides we identified as HLA-DP4 restricted T cell epitopes derive from the MAGE-A1 gene. MAGE-A1 was initially identified in a human melanoma cell line [32]. It is expressed in approximately half of metastatic melanomas, esophageal carcinomas and non-small cell lung carcinomas and in 80% of hepatocellular carcinomas [13, 31]. To our knowledge, only two MAGE-1 specific CD4+ T cell epitopes have been previously described [5, 6], namely MAGE-A1 281–292 and MAGE-A1 121–134. These two peptides are restricted to HLA-DR15 [5] and HLA-DR13 [6], respectively. Moreover, MAGE-A3 267–282 is restricted to HLA-DR1 and induces T cells, which recognize MAGE-A1 260–275 [39]. Two of these epitopes are closed to the MAGE-A1 268–282

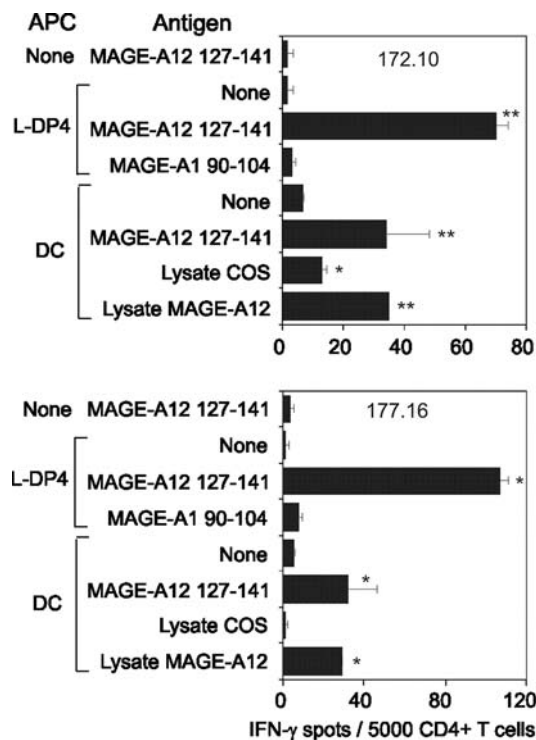


Fig. 3 Characterization of MAGE-A12 128–142 specific T cell lines. Two MAGE-A12 127–141 specific T cell lines (172.10 and 177.16) were submitted to an IFN- γ EliSpot assay as described for Fig. 1

peptide we identified, suggesting that this sequence region comprises multiple CD4⁺ T cell epitopes. Like MAGE-A3 267–282, the MAGE-A1 268–282 peptide is only slightly different from the homologous sequences of MAGE-A2, -A3, -A4, -A6, -A12, suggesting that these sequences may also contain HLA-DP4 restricted peptides. However, we did not assess their cross-reactivity. In contrast, MAGE-A1 90–104 we identified as an HLA-DP4 restricted T cell epitope

is not a conserved sequence. In particular, the I94, which is accommodated in the P1 pocket of HLA-DP4, is substituted by a D94 in most of the MAGE-A gene family. This substitution is not expected to favor the binding of the peptides to HLA-DP4 according to the HLA-DP4 binding motif [3]. It is noteworthy that the 90–104 encompasses the 96–104 sequence which is an HLA-A3 restricted T cell epitope [6]. This is reminiscent of the observations made on the NY-ESO-1 157–170 peptide which contains HLA-DP4 and HLA-A2 restricted T cell epitopes [37]. It therefore suggests that MAGE-A1 90–104 could be able to induce both CD4⁺ and CD8⁺ responses, as shown for the NY-ESO-1 157–170 peptide [37].

We demonstrated that MAGE-A12 127–141 is an HLA-DP4 restricted T cell epitope of the MAGE-A12 antigen. Moreover, T cells primed by this peptide recognized homologous sequences as MAGE-A11 130–144 and MAGE-A3 127–141. MAGE-A12 is frequently expressed in melanomas [13, 25] and could be the target of tumor-specific CTL [20]. Only the HLA-DR1 restricted MAGE-A3/12 267–282 peptide has been previously described as a CD4 T cell epitope of MAGE-A12 [39].

Finally, we describe in this paper potential HLA-DP4 restricted CD4⁺ T cell epitopes which require further investigations. We show that MAGE-A2 111–125, MAGE-A9 68–82 and MAGE-A9 153–167 were able to elicit peptide-specific T cell lines. Particularly, MAGE-A2 111–125 is worthy of investigation as it encompasses the sequence 112–120, which is an HLA-A*0201 restricted epitope in HLA-A2 transgenic mouse [33]. This peptide is homologous to the HLA-DR restricted T cell epitope MAGE-A3 111–125 [11]. We also show that the MAGE-A2 143–157, MAGE-A4 248–262, MAGE-A10 244–258 and MAGE-A10 303–317 peptides had a good affinity for HLA-DP4

Table 4 Capacity of MAGE-A analogs of MAGE-A2 111–125 and MAGE-12 127–141 to bind to HLA DP4 molecules

| Peptide | Sequence | | | | | | | | | | | | | | IC ₅₀ (DP401) | | IC ₅₀ (DP402) | | |
|-------------------------------|----------|---|---|----------|---|---|----------|---|----------|---|---|----------|---|---|--------------------------|--------|--------------------------|-------|--------------|
| | 1 | | | | 4 | | | | 6 | | | | 9 | | | | Pred. | Obs. | Pred. |
| MAGE-A3 111-125 ^a | R | K | V | A | E | L | V | H | F | L | L | L | K | Y | R | 562 | 100 (±0) | 100 | 35 (±2) |
| MAGE-A12 111-125 ^a | R | K | M | A | E | L | V | H | F | L | L | L | K | Y | R | 562 | 32 (±14) | 100 | 18 (±2) |
| MAGE-A11 130-144 ^b | K | G | L | I | T | K | A | E | M | L | G | S | V | I | K | 1,071 | 260 (±0) | 100 | 184 (±21) |
| MAGE-A1 120-134 ^b | R | E | P | V | T | K | A | E | M | L | E | S | V | I | K | 3,981 | 3,800 (±424) | 302 | 424 (±35) |
| MAGE-A2 130-144 ^b | R | E | P | V | T | K | A | E | M | L | E | S | V | I | R | 3,981 | 2,850 (±778) | 302 | 310 (±14) |
| MAGE-A3 127-141 ^b | R | E | P | V | T | K | A | E | M | L | G | S | V | I | G | 3,981 | 26,500 (±2121) | 302 | 4,250 (±354) |
| MAGE-A4 128-142 ^b | K | E | L | V | T | K | A | E | M | L | E | R | V | I | K | 21,877 | 2,400 (±566) | 2,398 | 414 (±49) |
| MAGE-A9 126-140 ^b | K | E | P | V | T | K | A | E | M | L | E | S | V | I | K | 3,981 | 2,900 (±707) | 302 | 639 (±35) |
| MAGE-A10 152-166 ^b | K | E | P | I | T | K | A | E | I | L | E | S | V | I | K | 1,905 | 1,500 (±0) | 602 | 570 (±35) |

^a The MAGE-A analogs of MAGE-A2 111–125 and ^b MAGE-12 127–141 were submitted to HLA-DP4 competitive ELISA under the same conditions as described in Table 1. Predicted (Pred.) and observed (Obs.) IC₅₀ are expressed in nM. Experimental values are the means of two to three experiments. The P1, P4, P6 and P9 positions are indicated in bold

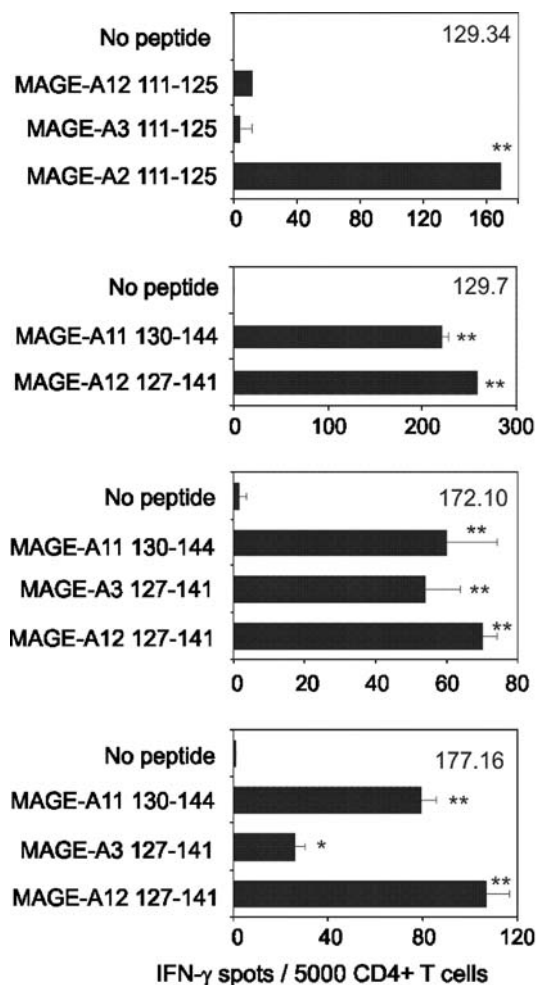


Fig. 4 Recognition of homologous MAGE peptides by MAGE2 111–125 and MAGE-A12 127–141 T cell lines. T cell lines specific for MAGE-A2 111–125 (129.34) or MAGE-A12 127–141 (129.7, 172.10 and 177.16) were incubated in an Elispot assay using L-DP4 as APC (2×10^4 /well). Peptides were added to the culture at a concentration of 10 μ g/ml. Each value represents the average spot number of the duplicates. Double asterisk and asterisk indicate $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively

molecules. This might be especially interesting for the MAGE-A10 244–258 peptide as it overlaps an HLA-A2 restricted CD8+ epitope [15]. The T cell priming ability of these peptides has not been investigated but their capacity to bind HLA-DP4 does not preclude the possibility that they are immunogenic.

In conclusion, we present in this paper the first selective identification of HLA-DP4 restricted T cell epitopes performed on the MAGE-A gene family. We mainly identified new epitopes in the MAGE-A1 antigen, one of them being stimulating for all the tested donors. The other sequences were also identified in multiple MAGE-A antigens, including MAGE-A12. Considering the high frequency of HLA-DP4 in the

population, these peptide sequences are of major interest for vaccine trials and immunomonitoring of the CD4+ T cell response raised against this major family of tumor-specific antigens.

Acknowledgments This work was supported by the CEA (BM), a grant from Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (BM), National Institutes of Health (NIH)/ National Cancer Institute (NCI) Grants CA90360 (HZ and BM) and CA112198 (HZ).

References

- Atanackovic D, Altorki NK, Stockert E, Williamson B, Jungbluth AA, Ritter E, Santiago D, Ferrara CA, Matsuo M, Selvakumar A, Dupont B, Chen YT, Hoffman EW, Ritter G, Old LJ, Gnjatic S (2004) Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients. *J Immunol* 172:3289–3296
- Buhot C, Chenal A, Sanson A, Pouvelle-Moratille S, Gelb MH, Menez A, Gillet D, Maillere B (2004) Alteration of the tertiary structure of the major bee venom allergen Api m 1 by multiple mutations is concomitant with low IgE reactivity. *Protein Sci* 13:2970–2978
- Castelli FA, Buhot C, Sanson A, Zarour H, Pouvelle-Moratille S, Nonn C, Gahery-Segard H, Guillet JG, Menez A, Georges B, Maillere B (2002) HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity. *J Immunol* 169:6928–6934
- Charron D, Fauchet R, Albert E, Bodmer J, Cambon-Thomsen A, Degos L, Hors J, Piazza A, Schreuder I (1997) (eds) Genetic diversity of HLA, functional and medical implication. In: Twelfth international histocompatibility workshop and conference, Charron D Paris, France
- Chaux P, Lethe B, Van Snick J, Corthals J, Schultz ES, Cambiaso CL, Boon T, van der Bruggen P (2001) A MAGE-1 peptide recognized on HLA-DR15 by CD4(+) T cells. *Eur J Immunol* 31:1910–1916
- Chaux P, Luiten R, Demotte N, Vantomme V, Stroobant V, Traversari C, Russo V, Schultz E, Cornelis GR, Boon T, van der Bruggen P (1999) Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1. *J Immunol* 163:2928–2936
- Chaux P, Vantomme V, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P (1998) Estimation of the frequencies of anti-MAGE-3 cytolytic T-lymphocyte precursors in blood from individuals without cancer. *Int J Cancer* 77:538–542
- Chaux P, Vantomme V, Stroobant V, Thielemans K, Corthals J, Luiten R, Eggermont AM, Boon T, van der Bruggen P (1999) Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes. *J Exp Med* 189:767–778
- Cibotti R, Cabaniols JP, Pannetier C, Delarbre C, Vergnon I, Kanellopoulos JM, Kourilsky P (1994) Public and private V beta T cell receptor repertoires against hen egg white lysozyme (HEL) in nontransgenic versus HEL transgenic mice. *J Exp Med* 180:861–872
- Cohen WM, Pouvelle-Moratille S, Wang XF, Farci S, Munier G, Charron D, Menez A, Busson M, Maillere B (2006) Scanning the HIV genome for CD4+ T cell epitopes restricted to HLA-DP4, the most prevalent HLA class II molecule. *J Immunol* 176:5401–5408

11. Consogno G, Manici S, Facchinetti V, Bachi A, Hammer J, Conti-Fine BM, Rugarli C, Traversari C, Protti MP (2003) Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+ T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3. *Blood* 101:1038–1044
12. Coulie PG, Karanikas V, Colau D, Lurquin C, Landry C, Marchand M, Dorval T, Brichard V, Boon T (2001) A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10290–10295
13. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C et al (1994) Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40:360–369
14. Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Wierenga EA, Scholz S, Santantonio T, Houghton M, Southwood S, Sette A, Pape GR (1997) Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 71:6011–6019
15. Huang LQ, Brasseur F, Serrano A, De Plaen E, van der Bruggen P, Boon T, Van Pel A (1999) Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A10 on a human melanoma. *J Immunol* 162:6849–6854
16. Kobayashi H, Song Y, Hoon DS, Appella E, Celis E (2001) Tumor-reactive T helper lymphocytes recognize a promiscuous MAGE-A3 epitope presented by various major histocompatibility complex class II alleles. *Cancer Res* 61:4773–4778
17. Lonchay C, van der Bruggen P, Connerotte T, Hanagiri T, Coulie P, Colau D, Lucas S, Van Pel A, Thielemans K, van Baren N, Boon T (2004) Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(Suppl 2):14631–14638
18. Mandic M, Castelli F, Janjic B, Almunia C, Andrade P, Gillet D, Brusic V, Kirkwood JM, Maillere B, Zarour HM (2005) One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4+ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Immunol* 174:1633–1640
19. Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De Greve J, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, Boon T (1999) Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80:219–230
20. Panelli MC, Bettinotti MP, Lally K, Ohnmacht GA, Li Y, Robbins P, Riker A, Rosenberg SA, Marincola FM (2000) A tumor-infiltrating lymphocyte from a melanoma metastasis with decreased expression of melanoma differentiation antigens recognizes MAGE-12. *J Immunol* 164:4382–4392
21. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10:909–915
22. Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G (2002) Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 195:1279–1288
23. Schultz ES, Lethe B, Cambiaso CL, Van Snick J, Chaux P, Corthals J, Heirman C, Thielemans K, Boon T, van der Bruggen P (2000) A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4+ cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* 60:6272–6275
24. Schultz ES, Schuler-Thurner B, Stroobant V, Jenne L, Berger TG, Thielemans K, van der Bruggen P, Schuler G (2004) Functional analysis of tumor-specific Th cell responses detected in melanoma patients after dendritic cell-based immunotherapy. *J Immunol* 172:1304–1310
25. Serrano A, Lethe B, Delroisse JM, Lurquin C, De Plaen E, Brasseur F, Rimoldi D, Boon T (1999) Quantitative evaluation of the expression of MAGE genes in tumors by limiting dilution of cDNA libraries. *Int J Cancer* 83:664–669
26. Southwood S, Sidney J, Kondo A, del Guercio MF, Appella E, Hoffman S, Kubo RT, Chesnut RW, Grey HM, Sette A (1998) Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J Immunol* 160:3363–3373
27. Tangri S, Mothe BR, Eisenbraun J, Sidney J, Southwood S, Briggs K, Zinckgraf J, Bilsel P, Newman M, Chesnut R, Licalsi C, Sette A (2005) Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. *J Immunol* 174:3187–3196
28. Texier C, Hervé M, Pouvelle S, Ménez A, Maillere B (1999) On the diversity and heterogeneity of H-2^d restricted determinants and T cell epitopes from the major bee venom allergen. *Int Immunol* 11:1313–1325
29. Texier C, Pouvelle-Moratille S, Buhot C, Castelli FA, Pecquet C, Menez A, Leynadier F, Maillere B (2002) Emerging principles for the design of promiscuous HLA-DR-restricted peptides: an example from the major bee venom allergen. *Eur J Immunol* 32:3699–3707
30. Valmori D, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Old LJ, Ayyoub M (2005) Quantitative and qualitative assessment of circulating NY-ESO-1 specific CD4(+) T cells in cancer-free individuals. *Clin Immunol* 117:161–167
31. Van den Eynde BJ, van der Bruggen P (1997) T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9:684–693
32. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643–1647
33. Visseren MJ, van der Burg SH, van der Voort EI, Brandt RM, Schrier PI, van der Bruggen P, Boon T, Melief CJ, Kast WM (1997) Identification of HLA-A*0201-restricted CTL epitopes encoded by the tumor-specific MAGE-2 gene product. *Int J Cancer* 73:125–130
34. Wang HY, Lee DA, Peng G, Guo Z, Li Y, Kiniwa Y, Shevach EM, Wang RF (2004) Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* 20:107–118
35. Zarour HM, Kirkwood JM, Kierstead LS, Herr W, Brusic V, Slingluff CL Jr, Sidney J, Sette A, Storkus WJ (2000) Melan-A/MART-1(51–73) represents an immunogenic HLA-DR4-restricted epitope recognized by melanoma-reactive CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:400–405
36. Zarour HM, Maillere B, Brusic V, Coval K, Williams E, Pouvelle-Moratille S, Castelli F, Land S, Bennouna J, Logan T, Kirkwood JM (2002) NY-ESO-1 119–143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4+ T cells. *Cancer Res* 62:213–218
37. Zeng G, Li Y, El-Gamil M, Sidney J, Sette A, Wang RF, Rosenberg SA, Robbins PF (2002) Generation of NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design. *Cancer Res* 62:3630–3635
38. Zeng G, Wang X, Robbins PF, Rosenberg SA, Wang RF (2001) CD4(+) T cell recognition of MHC class II-restricted

- epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3964–3969
39. Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Eggermont AM, Corthals J, Maillere B, Thielemans K, Marchand M, Boon T, Van Der Bruggen P (2003) A MAGE-3 peptide presented by HLA-DR1 to CD4(+) T cells that were isolated from a melanoma patient vaccinated with a MAGE-3 protein. *J Immunol* 171:219–225
40. Zhang Y, Renkvist N, Sun Z, Schuler-Thurner B, Glaichenhaus N, Schuler G, Boon T, van der Bruggen P, Colau D (2005) A polyclonal anti-vaccine CD4 T cell response detected with HLA-DP4 multimers in a melanoma patient vaccinated with MAGE-3.DP4-peptide-pulsed dendritic cells. *Eur J Immunol* 35:1066–1075
41. Zhang Y, Sun Z, Nicolay H, Meyer RG, Renkvist N, Stroobant V, Corthals J, Carrasco J, Eggermont AM, Marchand M, Thielemans K, Wolfel T, Boon T, van der Bruggen P (2005) Monitoring of anti-vaccine CD4 T cell frequencies in melanoma patients vaccinated with a MAGE-3 protein. *J Immunol* 174:2404–2411

Chapitre 8

Discussions générales et conclusions

L'induction et le maintien d'une réponse adaptative efficace nécessite l'intervention des lymphocytes T CD4+. Dans le cadre de l'élaboration de vaccins à base de peptides, il est donc aujourd'hui admis qu'il est nécessaire d'associer des épitopes T CD4+ au mélange vaccinal. Dans ce contexte, mon travail de recherche avait pour but d'identifier d'épitopes T CD4+ d'antigènes tumoraux. Deux stratégies d'identification ont été développées et appliquées à trois antigènes tumoraux différents : Trag-3 (travail effectué en collaboration), Survivine, et la famille d'antigènes MAGE-A. Ces deux stratégies sont : 1) identification d'épitopes T CD4+ présentés par plusieurs molécules de HLA II ; 2) identification d'épitopes T CD4+ présenté par une molécule exprimée par une majorité d'individus dans divers populations humaines. Avec ces deux stratégies, un peptide de Trag-3, 4 peptides de la Survivine, et 3 peptides de la famille de MAGE-A ont été mis en évidence.

8.1 L'efficacité de nos stratégies de recherche des épitopes T

La première stratégie appliquée à l'antigène Trag-3 et à l'antigène Survivine consiste à chercher des épitopes se fixant à plusieurs molécules HLA II . L'intégralité de la séquence des antigènes cibles a été couverte par des peptides chevauchants qui ont tous été testés pour leur capacité de liaison vis-à-vis de 12 molécules HLA-II (DR et DP). La réalisation de ces tests sur l'ensemble des séquences cibles n'est réalisable que pour des protéines de taille raisonnable. Ainsi le nombre de peptides à tester est

assez limité. En effet, seulement 15 et 27 peptides de Trag-3 et de la Survivine ont été respectivement synthétisés et testés. Dans un contexte réaliste de peptides à tester, il nous paraît plus satisfaisant d'avoir une approche exhaustive que d'avoir recours à des approches prédictives. Pour les molécules HLA-DR il existe un programme de prédiction développé par le groupe de Hammer en 1999 appelé TEPITOPE. Ce logiciel a été très utilisé avec de nombreux antigènes y compris sur les antigènes MAGE-A [Consonno et al., 2003]. Bien que le laboratoire possède un nombre élevé de données de liaison, il paraîtrait facile d'évaluer de manière précise l'efficacité de TEPITOPE. Mais la possibilité de faire varier le seuil de prédiction et le nombre élevé d'allèles que peut tester ce logiciel, demanderait en fait un travail très important. Toutefois, sans que cela soit quantifiable il n'est pas rare de trouver des peptides actifs alors que TEPITOPE ne les a pas trouvés. C'est pourquoi nous privilégions l'étude systématique de l'ensemble des peptides quand cela est possible.

En revanche, sur une famille complète d'antigènes ou sur des protéines de grande taille, il est nécessaire de faire appel à des programmes de prédiction. Comme pour HLA-DP4 il n'existait pas de tels programmes, nous l'avons mis en place en utilisant nos données de liaison publiées en 2002 et des données complémentaires présentées dans le Chapitre 6. En utilisant un seuil de prédiction de 500nM, nous avons sélectionnés 17 peptides, parmi lesquels 12 ont pu être synthétisés et testés. Ils ont tous été trouvés actifs conformément à la valeur prédictive calculée sur l'échantillon de 98 peptides présentés dans l'article sur la prédiction. Toutefois, d'après ces calculs, environ 50% des peptides ne sont pas prédits soit une douzaine. Pour augmenter l'efficacité de la prédiction il est nécessaire de porter le seuil de prédiction à 1000nM. Il nous aurait fallu alors synthétiser et tester 93 peptides. Il faut toutefois souligner qu'un facteur extrêmement limitant n'est pas d'évaluer la capacité de liaison mais d'évaluer la capacité de stimulation lymphocytaire des peptides *in vitro*. Sur les 12 peptides actifs seulement sept ont été effectivement évalués. Si nous avions trouvé d'autres peptides capables de lier les molécules HLA-DP4 nous n'aurions pas pu les évaluer dans les tests cellulaires.

Depuis Mars 2006, le laboratoire a mis en place un robot de criblage appelé HLA-express. Ce robot comporte 8 pipettes pour diluer les peptides et les réactifs puis les disposer dans les plaques. Il est également équipé de 2 bras de manipulation des plaques 96, d'un laveur de plaques et d'un lecteur de plaques en fluorescence. Il

réalise toutes les étapes de fixation de manière automatique et travaille en continu, sans surveillance. Ce robot peut effectuer une expérience avec 80 peptides différents et révéler la présence des complexes sur 18 plaques par nuit. Il constitue une aide remarquable pour le laboratoire, qui facilitera la réalisation des tests de fixation.

8.2 L'importance du répertoire en lymphocytes T dans la réponse contre les peptides

Un intérêt particulier de HLA-DP4 est que nous avons pu réaliser les mêmes expériences d'induction de lymphocytes T CD4+ à partir de plusieurs donneurs qui possèdent tous la même molécule HLA-DP4. Les variations d'activité des peptides ne sont donc plus dépendantes de la molécule HLA II puisque c'est la même molécule pour chaque donneur. Les différences ne proviennent pas de la machinerie d'apprêtement de l'antigène puisque par définition les peptides présentés sont directement captés par les molécules HLA II à la surface des cellules présentatrices. Cette différence entre individus résulte de la composition du répertoire T qui peut posséder un nombre plus ou moins important de précurseurs capables de reconnaître l'épitope CD4+. Par analogie avec les travaux effectués par Cibotti et al. [Cibotti et al., 1994] chez la souris, les épitopes T sont reconnus par un répertoire privé de lymphocytes T, c'est-à-dire de lymphocytes propres à chaque individu ou par un répertoire public de lymphocytes T, c'est-à-dire de lymphocytes communs à de nombreux individus. Ainsi le peptide MAGE-A1 90-104 qui stimule des lymphocytes chez tous les sujets est un épitope public, alors que le peptide MAGE-A1 268-282 est un épitope privé parce qu'il ne stimule qu'un nombre limité de donneurs. Le peptide MAGE-A12 127-141 est de type public mais sa fréquence de précurseurs est faible, proche du seuil de détection : 0,1 par million de cellules T CD4+. De même dans une autre recherche des peptides restreints à HLA-DP4 issus du VIH, les peptides identifiés sont soit publics soit privés.

De nombreux peptides ont été décrits dans la littérature comme étant communs à de nombreux individus. Il s'agit par exemple du peptide HA 306-318 de l'influenza et du peptide TT 830-843 de la toxine tétanique. Ces peptides se lient généralement à de nombreuses molécules HLA II [Krieger et al., 1991, O'Sullivan et al., 1991,

Sette et al., 1993]. Cette large complexité de liaison à des molécules HLA variées rend compte de leur immunogénicité pour une large population d'individus. Au vu des résultats que nous avons obtenus avec la molécule HLA-DP4, cette large spécificité n'est pas suffisante pour expliquer leur large capacité de stimulation de lymphocytes T. En particulier, au laboratoire, nous avons récemment montré sur des épitopes T issus de l'hépatite C l'existence de peptides ayant une large spécificité pour les molécules HLA II mais qui pourtant ne sont pas immunogènes (F. Castelli, soumis). L'ensemble de ces observations souligne l'importance du répertoire T dans l'intensité de la réponse immunitaire. Il est intéressant de noter que la réponse d'un épitope donné chez plusieurs individus est rarement évaluée. La plupart de ces études sont faites sur quelques voire un donneur seulement et ne permettent pas de savoir s'ils sont privés ou publics.

8.3 Immunodominance et immunoprévalence des épitopes T CD4+

Il y a souvent une confusion dans la littérature entre l'immunodominance telle que définie par Sercarz et la fréquence de réponses chez les individus. Selon Sercarz, le phénomène de l'immunodominance est décrit comme le fait que, suite à une immunisation avec une protéine, la réponse lymphocytaire T CD4+ ou CD8+ est dirigée uniquement contre un nombre limité de déterminants de cette protéine [Sercarz et al., 1993]. Les déterminants immunodominants sont ceux contre lesquels se fait la réponse T contre l'antigène natif. Ils sont portés par des peptides capables d'induire, par restimulation *in vitro*, une réponse proliférative forte et constamment observée des lymphocytes T sensibilisés *in vivo* avec la protéine entière. Ils se distinguent des déterminants cryptiques qui sont eux incapables de restimuler des cellules T après immunisation avec l'antigène intact. Toutefois, les peptides cryptiques peuvent induire une réponse contre eux-mêmes. Enfin, les déterminants sous-dominants forment une catégorie dont la définition est plus floue. En effet, ils induisent une prolifération des cellules T *in vitro* plus faible et plus variable que les déterminants dominants [Gammon et al., 1987]. Ces définitions ont été proposées pour des épitopes murins et dans des populations génétiquement homogènes. Elles n'ont donc rien à voir avec le nombre

d'individus répondeurs chez l'homme à un épitope défini. Pourtant, il n'est pas rare qu'un épitope T actifs chez de nombreux individus soit qualifié d'immunodominant.

C'est pourquoi, de manière à différencier ces notions nous proposons d'introduire la notion d'immunoprévalence par analogie à la prévalence des infections dans une population. Un épitope d'immunoprévalent pourrait qualifier un peptide qui est reconnu par au moins 50% des individus. Clairement le peptide MAGE-A1 90-104 est immunoprévalent puisqu'il est stimulant chez tous les donneurs. Le peptide MAGE-A12 127-141 est également immunoprévalent. En revanche le peptide MAGE-A1 268-282 et les autres peptides immunogènes ne le sont pas. Il est intéressant de noter que les peptides MAGE-A1 90-104 et MAGE-A12 127-141 sont également immunodominants dans la mesure où ils induisent des lymphocytes T qui reconnaissent l'antigène natif présenté par les DCs. L'exemple du peptide MAGE-A1 268-282 nous montre qu'un épitope peut être dominant sans être immunoprévalent.

Il est intéressant de noter que la plupart des épitopes T CD4+ ou CD8+ ont été identifiés à partir d'un nombre très limité de donneurs. La question se pose donc de savoir si ces épitopes décrits comme dominants sont également immunoprévalents, ce qui nécessite des études supplémentaires des réponses à ces épitopes. Cette question nous paraît d'autant plus pertinente qu'elle participe à l'efficacité vaccinale de chaque épitope.

8.4 Le choix de la molécule HLA II dans la stratégie de sélection des peptides

En terme d'impact au sein de la population, la stratégie de rechercher des peptides qui se lie à de nombreuses molécules HLA-DR ou qui se lie aux molécules HLA-DP4 est en principe équivalente. L'immunoprévalence d'un peptide qui se lie à HLA-DP4 ou qui se lie à de nombreuses molécules est attendue similaire. Toutefois, selon le répertoire de lymphocytes T capables de le reconnaître, l'immunoprévalence peut être très différente de celle attendue. C'est ce que nous avons observé pour les épitopes T CD4+ restreints à HLA-DP4 de la Survivine. En parallèle de la recherche systématique sur l'ensemble des peptides chevauchants de la survivine, nous avons également cherché des peptides restreints aux molécules HLA-DP4 par le programme de prédiction. 3

peptides étaient prédits actifs vis-à-vis des deux molécules HLA-DP4. Leur activité a été confirmée par les tests de liaison. Leur immunogénicité a été étudiée par leur capacité à générer des lignées de lymphocytes T CD4+ *in vitro*. Malheureusement, l'induction de lignées T CD4+ était difficile : 3 lignées ont été obtenues sur 5 donneurs (données non montrées). En revanche, les peptides restreints aux molécules HLA-DR étaient très actifs. 98 lignées ont été obtenues sur 7 donneurs et 7 peptides testés sont tous immunogènes (Tab. 5.3). Les tests de restriction ont montré que la plupart des réponses sont restreintes aux molécules HLA-DR. De plus il y a 3 donneurs communs dans les deux études : P169, P171, P174. Par exemple, pour le donneur P169, les peptides restreints à HLA-DP4 n'ont induit aucune lignée contre 14 lignées induites par les peptides restreints à HLA-DR. Clairement, la réponse contre la Survivine est essentiellement restreinte à HLA-DR malgré la présence d'au moins deux épitopes T restreints à HLA-DP4. A ma connaissance, il n'y a pas d'autres études similaires effectuées sur d'autres antigènes qui permettent de comparer l'importance des réponses restreintes à HLA-DR et à celles restreintes à HLA-DP4. On peut toutefois remarquer que la littérature décrit principalement des épitopes T restreints à HLA-DR et que compte tenu de la fréquence de HLA-DP4, le nombre d'épitopes T connus est peu important. Aussi, il ne paraît pas impossible que la molécule HLA-DP4 soit moins immunoréactive que les molécules HLA-DR d'autant plus que les molécules HLA-DR sont plus exprimées à la surface des cellules présentatrices que les autres molécules HLA II (2ème DR, DQ et DP).

Toutefois, nous devons souligner que la remarquable immunoprévalence d'un épitope tel que le MAGE-A1 90-104 démontre l'intérêt de HLA-DP4. De même dans le VIH, nous avons trouvé un épitope qui est systématiquement stimulant dans nos test de stimulation. Baser une stratégie de recherches d'épitopes T restreints à HLA-DP4 est donc peut-être plus risqué qu'une recherche d'épitopes T restreints aux molécules HLA-DR mais elle peut-être extrêmement fructueuse, comme l'illustrent ces deux exemples,.

8.5 Utilisation des épitopes T dans les essais cliniques

Dans les années passées, de nombreux épitopes immunodominants présentés par les molécules HLA I et II ont été décrits dans la littérature. En particulier, les épitopes restreints au HLA I ont été beaucoup testés en présence de différentes formules de vaccination. Comme nous l'avons déjà montré dans le Chapitre 3, l'efficacité de ces vaccins demeure faible et la régression de tumeurs est rare par rapport au nombre de personnes vaccinées. Pour expliquer cette défaillance, une cause possible est liée à la nature des antigènes employés. Des antigènes surexprimés dans les tumeurs sont aussi exprimés dans les cellules normales. Ainsi les antigènes ont été exposés au système immunitaire et ont induit un certain degré de tolérance chez l'hôte. En conséquence, les vaccins à base d'antigènes surexprimés doivent surmonter l'état de tolérance du système immunitaire pour activer les réponses immunes utiles. Pour cela, la recherche d'épitopes cryptiques pourrait être une issue pour ce problème. Une autre cause possible liée à l'antigène est la pression de sélection de tumeurs. Il se peut que les tumeurs n'expriment plus l'épitope ou que la séquence soit modifiée. Une analyse immunohistochimique des biopsies a été effectuée chez des patients qui avaient initialement répondu à un peptide d'antigène du mélanome puis rechuté en présence des CTLs spécifiques de ce peptide. Cette analyse a montré une perte progressive de l'expression de l'antigène en association avec une progression de la maladie [Parmiani et al., 2002]. Un moyen d'éviter ces échappements serait l'induction d'une réponse immunitaire polyclonale capable de reconnaître de multiples déterminants antigéniques, en employant des vaccins multi-épitopiques.

Des mécanismes régulateurs peuvent aussi supprimer la réponse antitumorale induite par les vaccins. Probablement, l'un de ces mécanismes les plus importants est l'action des lymphocytes CD4⁺CD25⁺ (Treg). Ces cellules sont présentes dans le sang et ont la capacité de supprimer la prolifération et les fonctions des cellules effectrices. Cette découverte mène à une réexploration du concept selon lequel des réponses immunes antitumorales pourraient être bloquées par ces cellules Tregs. Wang et al. [Wang et al., 2004] ont rapporté que l'antigène LAGE-1 était la cible de clones CD4⁺ Treg dérivés à partir de TILs d'un patient atteint de mélanome. Les analyses phénotypiques et fonctionnelles ont montré que ces Tregs expriment CD25 et exercent

une activité suppressive sur la réponse proliférative des cellules T CD4⁺ naïves après la restimulation de l'anticorps anti-CD3 [Wang et al., 2004].

Plusieurs rapports ont documenté la possibilité d'éliminer les cellules Treg pour faciliter le rejet de la tumeur [Shimizu et al., 1999, Steitz et al., 2001, Suttmuller et al., 2001, Onizuka et al., 1999]. De plus, l'élimination des Treg permet l'activation des cellules T CD8⁺ spécifiques de tumeur [Shimizu et al., 1999, Steitz et al., 2001, Suttmuller et al., 2001]. En outre, les publications récentes ont montré que les cellules Treg peuvent contribuer au contrôle des réponses de cellules T CD8⁺ mémoire [Kursar et al., 2002, Murakami et al., 2002]. Ces rapports suggèrent que l'inhibition de l'action de cellules Treg pourrait avoir un effet bénéfique sur l'induction de l'immunité antitumorale et améliorer l'efficacité de stratégies vaccinales. Un point totalement mal connu est de savoir dans quel mesure la nature de l'antigène influence la propension à stimuler des cellules Treg ou effectrices.

Actuellement, un traitement efficace pour des patients présentant le mélanome metastatique concerne l'obtention des cellules T spécifiques de tumeurs, et la prolifération de ces cellules T *in vitro*. Ensuite ces cellules T sont réinjectées dans les patients lymphodéplétés. Ce traitement est appelé le transfert de cellules adoptives. Cependant il n'y pas beaucoup de patients qui satisfont les critères pour accepter ce traitement, par exemple le manque de TILs viables spécifiques de tumeurs. Une solution potentielle à ces problèmes est la transduction/transfection du gène codant le TCR spécifique de tumeur dans le PBL du patient pour les convertir en cellules T spécifiques de tumeurs [Hughes et al., 2005, Cohen et al., 2005, Zhao et al., 2005]. Ce type d'expérience a été récemment rapporté dans un modèle de souris, montrant que les cellules T transfectées avec un retrovirus codant un TCR contre l'antigène OVA peuvent persister et fonctionner *in vivo* dans les souris transgéniques de l'antigène OVA [de Witte et al., 2006]. Dans le travail dirigé par Rosenberg, plusieurs clones spécifiques du peptide MART-1 27-35 ont été isolés à partir de TILs des patients atteints de mélanome. Les gènes de la chaîne α et β du TCR, ainsi que l'ARN du TCR sont transfectés par l'électroporation dans les PBMC et les TILs d'un patient allogénique ne présentant pas de lymphocytes T spécifiques de MART-1. Toutes les cellules récipientes ont obtenu la capacité à reconnaître le peptide MART-1 27-35 et les cellules tumorales exprimant le MART-1 *in vitro* [Johnson et al., 2006].

Enfin, le manque d'efficacité clinique des vaccins peptidiques actuels ne doit pas

nous inciter à penser que cette approche vaccinale est définitivement infructueuse. Il semble que toutes les ressources d'induction de réponses immunitaires par les peptides n'aient pas été entièrement exploitées. Alors que l'importance de cellules T CD4+ dans l'immunité antitumorale est clairement documentée et que de nombreux épitopes T CD4+ ont été identifiés, il y a très peu d'études cliniques utilisant des épitopes T CD4+. Seulement quelques épitopes ont été testés comme HER-2/neu p369-384 [Knutson et al., 2001], MAGE-A3 243-258 [Schuler-thurner et al., 2002]. De plus, différents adjuvants, comprenant les cytokines, les agonistes des récepteurs *Toll-like* ou d'autres molécules de stimulation devraient être utilisés et entrer dans la composition de nouveaux vaccins, ainsi que la transfection du gène codant TCR spécifique de peptide. Tous ces points devraient contribuer à la réussite de la vaccination peptidique.

8.6 Conclusions

Etant donné le rôle central des cellules T CD4+ dans l'induction et le maintien des réponses immunes contre le cancer, il est important d'incorporer les épitopes T CD4+ dans les vaccins visant à stimuler une immunité antitumorale efficace.

Les épitopes T CD4+ de la Survivine et Trag-3 identifiés sont d'intérêt pour l'ensemble de la population Européenne et Nord Américaine en se liant aux multiples molécules HLA II les plus représentées. Les épitopes T CD4+ identifiés au sein de MAGE-A restreints au HLA-DP présentent également une immunoprévalence élevée en raison de la fréquence de la molécule HLA-DP4 dans les populations humaines. Ainsi tous les épitopes identifiés dans ce travail ont d'intéressantes perspectives d'utilisation en diagnostic et en thérapeutique. Ils pourront tous être testés dans des formulations de vaccins peptidiques différents, soit tout seul, soit avec un adjuvant, soit chargé avec les DCs.

Dans ce travail, nous avons aussi proposé une méthode de prédiction de liaison de HLA-DP4 qui facilite significativement la sélection des peptides. L'ensemble de nos données contribue au développement de vaccins peptidiques et d'outils d'immunomonitorage ainsi qu'à une meilleure connaissance des molécules HLA II.

Annexe

Scanning the HIV Genome for CD4⁺ T Cell Epitopes Restricted to HLA-DP4, the Most Prevalent HLA Class II Molecule¹

William M. Cohen,* Sandra Pouvelle-Moratille,* Xiao-Fei Wang,* Sandrine Farci,* Gaetan Munier,* Dominique Charron,[†] André Ménez,* Marc Busson,[†] and Bernard Maillere^{2*}

HLA-DP4 alleles are carried by 75% of individuals and are the most frequent HLA II alleles worldwide. Because we have recently characterized the peptide-binding specificity of HLA-DP4 molecules, we developed a peptide-binding prediction method to identify HLA-DP4-restricted peptides in multiple Ags. CD4⁺ T cell response plays a key role in the immune control of HIV infection, but few HIV-specific T cell epitopes with multi-individual specificity have been identified. They are mostly restricted to HLA-DR molecules, which are very polymorphic molecules. We therefore looked for HLA-DP4-restricted CD4⁺ T cell epitopes in the whole genome of HIV. Twenty-one peptides were selected from the HXB2 HIV genome based on the prediction of binding to HLA-DP4 molecules. They were submitted to HLA-DP4-binding assays. Seventeen peptides bound to the HLA-DP401 molecule, whereas 15 peptides bound to HLA-DP402. Six peptides bound very tightly to HLA-DP401 and were investigated for their capacity to induce specific CD4⁺ T cell lines in vitro using dendritic cells and CD4⁺ T cells collected from eight seronegative HLA-DP4⁺ donors. Four peptides from env and reverse transcriptase proteins induced in vitro-specific T cell lines restricted to HLA-DP4 molecules. Peptide-induced T cells recognized variants other than the HXB2 sequence and were stimulated by native Ags processed by immature dendritic cells. The reverse transcriptase peptide is present in 65% of the isolated HIV variants. To our knowledge, we describe the first HIV epitopes restricted to HLA-DP4 molecules. *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 5401–5408.

Among all HLA II molecules, HLA-DP4 molecules have the unique property of being present at a high frequency worldwide. They comprise mainly two different molecules, namely HLA-DPA1*0103/DPB1*0401 (DP401) and HLA-DPA1*0103/DPB1*0402 (DP402), which differ by only 3 aas and have a very similar binding motif (1). HLA-DP4 gene frequency is ~50% in Europe, 60% in South America, 80% in North America, 60% in India, 25% in Africa, and only 15% in Japan (2). In the Caucasian population, HLA-DP4 molecules are found in ~76% percent of individuals and hence are as frequent as the HLA-A2 molecule, which is the predominant HLA I molecule. Multiple immunological studies have taken advantage of the high frequency of HLA-A2 to delineate relevant CTL epitopes, to evaluate vaccine efficiency or to document cellular immunity of patients affected by different disease stages. The high frequency of the HLA-DP4 molecules is fruitfully exploited to investigate the CD4 T cell response to tumors. HLA-DP4-restricted T cell epitopes were delineated by chance in the MAGE-3 (3) and NY-ESO-1 tumor Ags (4, 5). Mel-

anoma patients have been vaccinated with dendritic cells (DC)³ loaded with the HLA-DP4-restricted peptide MAGE-3 (6, 7). Recently, functional HLA-DP4 multimers were produced with the MAGE-3 peptide and have been used to evaluate the frequencies of peptide-specific T cells induced by vaccination (8). Moreover, HLA-DP4-restricted T cell response is not limited to tumor Ags because several T cell lines and clones have been isolated from various pathogens, including viruses (9–11), demonstrating clearly the immune functionality of HLA-DP4 molecules.

In contrast, CD4 T cell response against HIV is a growing subject of interest. HIV infection promotes a progressive decline of CD4 T cells, which is successfully compensated by the highly active antiretroviral therapy (12). Virus load appears to diminish the proliferative capacity of HIV-specific T cells (13, 14) and hence the cell-mediated immunity against HIV (15). Ag persistence has been associated with a significant frequency of effector memory CD4⁺ T cells, which produce exclusively IFN- γ and are short lived (16–18). In contrast, proliferative CD4⁺ T cell response to HIV components has been found to correlate inversely with viral load (19) and may result from the presence of central memory T cells, which produce IL-2 and are long lived (17, 18). Restoration of HIV CD4⁺ T cells by highly active antiretroviral therapy seems, however, to be limited and did not appear to involve central memory cells (12, 20). To document all of these cellular investigations and to propose peptide sequences for the design of epitope-based vaccines, CD4⁺ T cell epitopes from HIV have been identified. They derived from GAG (21–24), env (25, 26), POL (21, 27, 28), and Nef (24, 29). They are almost all restricted to HLA-DR, very few epitopes being HLA-DQ-restricted (25, 29) and HLA-DP5-restricted (25). Some of these peptides

*Protein Engineering and Research Department, Commissariat à l'Energie Atomique Saclay, Gif sur Yvette, France; and [†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U396, Hôpital St. Louis, Paris, France

Received for publication November 22, 2005. Accepted for publication February 8, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the CEA and by the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA Vaccine Network. The National Institute for Biological Standards and Control Centralized Facility for AIDS Reagents is supported by European Union Programme European Vaccine against AIDS/Medical Research Council (contract QLKZ-CT-1999-00609).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Bernard Maillere, Protein Engineering and Research Department, bat 152, CEA-Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France. E-mail address: bernard.maillere@cea.fr

³ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; RT, reverse transcriptase.

were able to bind to multiple HLA-DR molecules and were recognized by T cell lines deriving from multiple individuals (21, 24, 26). However, none of them are restricted to the prevalent HLA-DP4 molecules.

Based on the previous binding data we obtained to characterize the binding specificity of HLA-DP4 molecules, we recently set up a new approach to delineate HLA-DP4-restricted T cell epitopes and applied it to the whole genome of HIV. Combining peptide-binding prediction, peptide-binding assays, and CD4⁺ T cell priming experiments allowed us to successfully find the first HLA-DP4-restricted T cell epitopes of HIV.

Materials and Methods

Peptides and Ags

Peptides were synthesized using standard Fmoc chemistry on a multiple peptide synthesizer APEX 396 (Advanced ChemTech). They were cleaved from the resin by 95% trifluoroacetic acid. Peptides, which exhibited a purity lower than 80%, were purified by reversed phase-HPLC on a C₁₈ Vydac column (Interchim). The peptide bOxy 271-287 was biotinylated with biotinyl-6-aminocaproic acid (Fluka Chimie) on the N terminus before cleavage from the resin and HPLC purification. The sequence of each peptide was assessed by mass spectroscopy. Reverse transcriptase (RT) (recombinant HIV-1 HXB2 RT) and Gp120 (recombinant HIV-1IB Gp120) are from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) Centralized Facility for AIDS Reagents (Herts, U.K.). RT is a gift from Dr. D. Stammer (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC).

HLA-DP4-specific peptide-binding assays

EBV homozygous cell lines PITOUT (DPA1*0103, DPB1*0401), HOM2 (DPA1*0103, DPB1*0401), and SCHU (DPA1*0103, DPB1*0402) were a gift from Dr. C. de Toma and J. Dausset (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, Paris, France). They were used as sources of human HLA-DP4 molecules. B7/21 hybridoma was a gift from Dr. Y. van de Wal (Department of Immunohematology and Blood Bank, Leiden, The Netherlands). mAb B7/21 was immunopurified from cell culture supernatants on Sepharose protein A gel as recommended by the manufacturer (Amersham Pharmacia Biotech). HLA-DP4 molecules were purified by affinity chromatography using B7/21 mAb coupled to protein A-Sepharose CL 4B gel (Pharmacia Biotech) as described previously for L243 mAb (30). Binding assays were performed by competitive ELISA as described previously (1). Briefly, 10 nM bOxy 271-287 peptide, an appropriate dilution of HLA-DP4 molecules, and serial dilutions of the peptide to be tested were incubated at 37°C for 24 h. Samples were then neutralized and applied to B7/21-coated plates for 2 h. Bound biotinylated peptide was detected by means of streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Amersham Biosciences) and 4-methylumbelliferyl phosphate substrate (Sigma-Aldrich). Emitted fluorescence was measured at 450 nm upon excitation at 365 nm in a Victor II spectrofluorimeter (PerkinElmer). Data were expressed as the peptide concentration that prevented binding of 50% of the labeled peptide (IC₅₀). IC₅₀ values of the Oxy 271-287 peptide served as a reference in each experiment.

Blood samples and HLA-DP genotyping

Blood cells were collected at the Etablissement Français du Sang (EFS) as buffy-coat preparations from anonymous healthy donors after informed consent and following the guidelines of EFS. Seronegativity of the donors was assessed using standard EFS protocols. PBMC were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hypaque gradients (Sigma-Aldrich). Genotyping was performed using the Olerup SSP DPB1 typing kit (Olerup SSP) according to the manufacturer. HLA-DPB genotyping results were the following: donor 48 (0401/1301), donor 51 (0301/0401), donor 119 (0401/0601), donor 120 (03/0401), donor 123 (03/0401), donor 147 (0401), donor 156 (0401), donor 157 (0401).

Induction of CD4⁺ T cells with peptides

The induction of CD4⁺ T cells in vitro with HIV peptides was based on a protocol described previously (31, 32). Immature and mature DCs were generated from plastic-adherent PBMC by a 5-day culture in AIM-V medium supplemented with 1000 U/ml recombinant human GM-CSF (R&D Systems) and 1000 U/ml recombinant human IL-4 (R&D Systems). LPS (Sigma-Aldrich) (1 µg/ml) was used as maturation agent. CD4⁺ T lymphocytes were isolated from nonadherent PBMC by positive selection using an anti-CD4 mAb coupled to magnetic microbeads (Miltenyi Biotec). Mature DCs were incubated at 37°C, 5% CO₂, for 4 h in IMDM (Invitro-

gen Life Technologies) supplemented with 24 mM glutamine, 55 mM asparagine, 150 mM arginine (all amino acids were obtained from Sigma-Aldrich), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Invitrogen Life Technologies), and 10% human serum (hereafter referred to as complete IMDM) with a solution of the HIV peptide mixture (10 µg/ml each peptide). Pulsed mature DCs were added at 10⁴ per round-bottom microwell to 10⁵ autologous CD4⁺ lymphocytes in 200 µl of complete IMDM supplemented with 1000 U/ml IL-6 (R&D Systems) and 10 ng/ml IL-12 (R&D Systems). The CD4⁺ T lymphocytes were restimulated on days 7, 14, and 21 with autologous DCs freshly loaded with the HIV peptide mixture, and were grown in complete IMDM supplemented with 10 U/ml IL-2 (R&D Systems) and 5 ng/ml IL-7 (R&D Systems). The stimulated CD4⁺ T cells were analyzed for specificity in ELISPOT assays at least 6 days after the last stimulation. The frequency of MAGE-specific precursors was calculated on the basis of the Poisson distribution. Accordingly, an estimate of the precursor frequency is given by the following formula: precursor frequency = -ln[(number of negative wells)/(number of wells tested)].

IFN-γ ELISPOT

Multiscreen HA plates (Millipore) were coated with 1 µg/ml mAb anti-human IFN-γ (1-D1K; Mabtech) in PBS (Invitrogen Life Technologies) for 1 h at 37°C and saturated with complete IMDM. APCs were autologous immature DCs or HLA-DP4-transfected L cells (L-DP4 cells) (provided by Dr. H. Zarour, Pittsburgh University Cancer Institute, Pittsburgh, PA). HIV proteins were incubated for 4 h at 37°C at a concentration of 1 µM with immature DCs, which were subsequently washed before use. Peptides were directly added to the Multiscreen plates. Immature DCs (2 × 10⁴/well) or L-DP4 cells (3 × 10⁴/well) were distributed in Multiscreen plates together with 2 × 10³ to 10⁴ CD4⁺ T cells. After overnight incubation at 37°C, captured IFN-γ was detected by subsequent addition of biotinylated mAb anti-hIFN-γ (7-B6-1; Mabtech) (0.2 µg/ml), extravidin-phosphatase (Sigma-Aldrich) and NBT/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma-Aldrich). Spot number was automatically determined by the AID ELISPOT Reader System (AID). The *t* test was used for statistical evaluation.

Results

Selection of HLA-DP4-binding peptides in the HIV genome

We have recently characterized the peptide-binding motifs of HLA-DP401 and HLA-DP402 molecules. The amino acid selectivity of pockets 1, 4, 6, and 9 of their peptide-binding cleft was investigated by substituting the corresponding positions with various amino acids and by quantifying their effects on the binding (1). We completed this study with new binding data (M. Busson, F. A. Castelli, X.-F. Wang, W. M. Cohen, D. Charron, A. Ménez, and B. Maillère, manuscript in preparation) and built quantitative matrices of binding to HLA-DP4 molecules (Table I), as previously done for HLA-DR molecules by others (33, 34). To predict the peptide binders to HLA-DP4, we assigned to all 9-mer of a sequence a predicted IC₅₀ by addition of the values in the P1, P4, P6, and P9 pockets for each corresponding amino acid of the peptide (Table I). Efficiency of the prediction was assessed using a set of 98 unrelated peptides, among which 17 bound to HLA-DP401. For an expected IC₅₀ of 300 nM, we observed that eight were correctly predicted (47%) and two were predicted to be active, although they did not bind to HLA-DP401 (M. Busson, F. A. Castelli, X.-F. Wang, W. M. Cohen, D. Charron, A. Ménez, and B. Maillère, manuscript in preparation). In the HXB2 HIV sequence, we retained all the peptides, which exhibited an expected IC₅₀ below 300 nM and excluded most of the peptides with a moderate predicted activity and a low frequency among HIV isolates. The 21 chosen peptides derived from five different proteins of HIV and showed various levels of conservation (Table II). They were synthesized and submitted to HLA-DP4-binding assays (Table II). On the basis of an activity threshold of 1000 nM, 17 peptides bound to HLA-DP401 and 15 peptides to HLA-DP402. Fourteen peptides bound to both molecules, in agreement with our previous observations that HLA-DP4 molecules share a large number of peptide binders (1). Six peptides (env 31-45, env 388-402, env 620-634, RT 338-352, Vpr 15-29, and Vpr 61-75) were very good binders to HLA-DP401 (IC₅₀ below 100 nM) and were selected for cellular assays.

Table I. Matrices of binding prediction to HLA-DP401 and HLA-DP402^a

| Amino Acids | DP401 Pockets | | | | DP402 Pockets | | | |
|-------------|---------------|------|------|------|---------------|------|------|------|
| | 1 | 4 | 6 | 9 | 1 | 4 | 6 | 9 |
| A | 1.60 | 0.00 | 2.38 | 0.60 | 0.85 | 0.00 | 1.88 | 0.60 |
| D | 1.70 | 0.30 | 3.32 | 0.85 | 1.76 | 0.30 | 3.85 | 0.90 |
| E | 1.85 | 0.30 | 2.90 | 1.04 | 1.85 | 0.48 | 2.90 | 0.90 |
| F | 0.00 | 0.30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.70 |
| G | 2.20 | 0.00 | 3.85 | 1.18 | 1.76 | 0.00 | 3.57 | 1.08 |
| H | 2.17 | 0.78 | 3.40 | 1.11 | 1.56 | 0.30 | 2.33 | 1.54 |
| I | 0.48 | 0.30 | 0.85 | 0.00 | 0.30 | 0.30 | 0.78 | 0.48 |
| K | 2.60 | 1.48 | 2.43 | 1.85 | 2.28 | 0.70 | 2.28 | 1.90 |
| L | 0.48 | 0.30 | 0.78 | 0.00 | 0.48 | 0.30 | 0.70 | 0.00 |
| M | 0.48 | 0.30 | 0.60 | 0.00 | 0.48 | 0.30 | 0.00 | 0.30 |
| N | 2.32 | 0.60 | 3.15 | 1.15 | 1.78 | 0.60 | 3.08 | 0.85 |
| P | 1.98 | 0.48 | 2.32 | 0.95 | 1.68 | 0.30 | 1.08 | 0.48 |
| Q | 2.41 | 0.60 | 3.85 | 0.90 | 1.99 | 0.60 | 2.36 | 0.30 |
| R | 2.14 | 1.15 | 3.85 | 1.70 | 1.73 | 0.70 | 2.57 | 1.60 |
| S | 2.20 | 0.30 | 2.70 | 0.95 | 1.62 | 0.48 | 1.52 | 0.70 |
| T | 2.15 | 0.00 | 2.85 | 0.60 | 1.85 | 0.00 | 2.48 | 0.60 |
| V | 1.04 | 0.15 | 1.62 | 0.30 | 0.78 | 0.15 | 1.34 | 0.30 |
| W | 0.00 | 0.30 | 0.30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.30 | 1.11 |
| Y | 0.48 | 0.60 | 0.30 | 0.30 | 0.48 | 0.00 | 0.48 | 1.18 |
| C | 2.32 | 0.60 | 1.23 | 1.15 | 1.78 | 0.60 | 0.30 | 0.85 |

^a The matrices were built based on the binding data to HLA-DP401 and HLA-DP402 of analogs substituted at position 1, 4, 6, and 9 (1) (M. Busson, F. A. Castelli, X.-F. Wang, W. M. Cohen, D. Charron, A. Ménez, and B. Maillère, manuscript in preparation). Prediction values are the log10 of the binding loss observed for each analog or for a similar analog. The score of binding of a peptide was calculated by addition of the values of its amino acids accommodated in the 1, 4, 6, and 9 pocket. Predicted IC₅₀ were deduced from the binding score as the following: predicted IC₅₀ = 10^(score+1) nM.

Four HIV peptides are able to prime peptide-specific CD4⁺ T cell lines

Eight HLA-DP4⁺-seronegative donors were used to investigate the T cell priming capacity of the selected peptides. These assays were conducted as described previously (31, 32). Autologous mature DCs were loaded with a mixture of the six peptides for 4 h and distributed with purified CD4⁺ T lymphocytes in 60 different microculture wells. Microcultures were restimulated weekly with peptide-

pulsed mature DCs and an appropriate mixture of cytokines. Using a peptide mixture makes it possible to increase the number of seeded wells for each peptide and hence to increase the probability for each peptide of encountering a peptide-specific T cell precursor. After three stimulations, peptide specificity of growing T lymphocytes was tested by IFN-γ ELISPOT using HLA-DP4-transfected L cells (HLA-DP4) as APC. Twenty-two bulk CD4 T cell lines were specific for the peptide mixture (Table III). Their

Table II. Selection of peptides from the HIV genome for their capacity to bind HLA-DP4 molecules^a

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | DP401 | | DP402 | |
|-------------|--------|---|---|---|----------|---|---|----------|----------|----------|---|---|----------|---|---|---|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Sequences | | | | | | | | | | | | | | | | | | Pred. | Expt. | Pred. | Expt. |
| Peptides | Fr (%) | | | | | | | | | | | | | | | | | IC ₅₀ | IC ₅₀ | IC ₅₀ | IC ₅₀ |
| Reference | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 14 (±5) | | 15 (±3) |
| env 31–45 | 10.0 | T | E | K | L | W | V | T | V | Y | Y | G | V | P | V | W | 120 | 4 (±0) | 180 | 22 (±4) | |
| env 388–402 | 0.4 | T | Q | L | F | N | S | T | W | F | N | S | T | W | S | T | 40 | 12 (±0) | 40 | 7 (±2) | |
| env 483–497 | 27.0 | L | Y | K | Y | K | V | V | K | I | E | P | L | G | V | A | 295 | 424 (±35) | 255 | 194 (±71) | |
| env 620–634 | 0.3 | E | Q | I | W | N | H | T | T | W | M | E | W | D | R | E | 20 | 35 (±15) | 20 | 794 (±141) | |
| env 670–684 | 1.0 | W | N | W | F | N | I | T | N | W | L | W | Y | I | K | L | 40 | 1000 (±0) | 300 | 2000 (±0) | |
| env 677–691 | 0.1 | W | L | W | W | Y | I | K | L | F | I | M | I | V | G | G | 302 | 305 (±216) | 150 | 387 (±141) | |
| env 684–698 | 1.0 | L | F | I | M | I | V | G | G | L | V | G | L | R | I | V | 182 | 173 (±35) | 150 | 364 (±790) | |
| env 760–774 | 21.0 | L | R | S | L | C | L | F | S | Y | H | R | L | R | D | L | 120 | 624 (±35) | 90 | 406 (±120) | |
| P24 29–43 | 44.0 | E | K | A | F | S | P | E | V | I | P | M | F | S | A | L | 141 | 2427 (±850) | 900 | 3217 (±1550) | |
| P24 130–144 | 87.0 | Y | K | R | W | I | I | L | G | L | N | K | I | V | R | M | 120 | 917 (±1200) | 300 | 149 (±28) | |
| RT 5–19 | 72.0 | T | L | N | F | P | I | S | P | I | E | T | V | P | V | K | 282 | 3744 (±2800) | 360 | 3947 (±212) | |
| RT 249–263 | 58.0 | K | D | S | W | T | V | N | D | I | Q | K | L | V | G | K | 282 | 27589 (±17000) | 240 | 2569 (±566) | |
| RT 263–277 | 21.0 | K | L | N | W | A | S | Q | I | Y | P | G | I | K | V | R | 40 | 822 (±106) | 180 | 2739 (±354) | |
| RT 338–352 | 65.0 | T | Y | Q | I | Y | Q | E | P | F | K | N | L | K | T | G | 60 | 34 (±6) | 60 | 31 (±4) | |
| RT 346–360 | 8.0 | F | K | N | L | K | T | G | K | Y | A | R | M | R | G | A | 60 | 424 (±35) | 180 | 114 (±21) | |
| RT 403–417 | 28.0 | T | E | Y | W | Q | A | T | W | I | P | E | W | E | F | V | 71 | 106 (±53) | 780 | 45 (±7) | |
| RT 408–422 | 81.0 | A | T | W | I | P | E | W | E | F | V | N | T | P | P | L | 240 | 630 (±28) | 80 | 1849 (±71) | |
| RT 456–470 | 55.0 | S | P | A | I | F | Q | S | S | M | T | K | I | L | E | P | 240 | 967 (±177) | 180 | 456 (±85) | |
| Vif 61–75 | 7.0 | D | A | R | L | V | I | T | T | Y | W | G | L | H | T | G | 60 | 1332 (±20) | 90 | 359 (±57) | |
| Vpr 15–29 | 2.0 | H | N | E | W | T | L | E | L | L | E | E | L | K | S | E | 120 | 62 (±11) | 150 | 57 (±11) | |
| Vpr 61–75 | 0.1 | I | R | I | L | Q | Q | L | L | F | I | H | F | F | R | I | 60 | 42 (±16) | 300 | 52 (±25) | |

^a The genome of the HXB2 variant was entirely scanned for prediction of HLA-DP4-binding activities. Presumed active peptides were synthesized and tested for their capacity to bind to HLA-DP401 and HLA-DP402 by a competitive ELISA. Predicted (Pred.) and experimental (Exp.) IC₅₀ values are expressed in nM. Experimental IC₅₀ values are the means of two to three independent experiments. Fr corresponds to the frequency of the sequence among the HIV sequences (Los Alamos HIV databases (<http://hiv-web.lanl.gov>)). The reference peptide used in these assays is the Oxy 271–287 peptide (EKKYFAATQFEPLAARL). Letters in bold are the P1, P4, P6, and P9 anchor residues.

Table III. Peptide specificity and restriction of T cell lines induced by the HIV-1 peptide mixture^a

| T cell lines | Number of Spots | | | | | | Restriction control |
|--------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|----------------|----------------|---------------------|
| | None | Peptide mixture | RT 338–352 | env 31–45 | env 388–402 | env 620–634 | |
| 48–29 | 8 (±4) | 322 (±18) | 13 (±3) | 372 (±76) | 10 (±4) | 9 (±8) | n.d. |
| 51–1 | 30 (±21) | 79 (±9) | 101 (±4) | 22 (±12) | 19 (±6) | 28 (±4) | n.d. |
| 51–2 | 27 (±3) | 235 (±24) | 191 (±19) | 16 (±2) | 7 (±1) | 34 (±4) | n.d. |
| 51–18 | 9 (±4) | 57 (±8) | 34 (±2) | 21 (±1) | 22 (±5) | 71 (±4) | n.d. |
| 51–19 | 11 (±10) | 351 (±46) | 387 (±16) | 7 (±1) | 13 (±1) | 11 (±1) | n.d. |
| 51–27 | 21 (±4) | 58 (±4) | 10 (±5) | 3 (±4) | 65 (±5) | 15 (±2) | n.d. |
| 51–41 | 25 (±4) | 88 (±9) | 28 (±3) | 31 (±7) | 85 (±9) | 32 (±3) | n.d. |
| 51–54 | 7 (±4) | 59 (±8) | 8 (±4) | 74 (±13) | 6 (±1) | 9 (±4) | n.d. |
| 119–30 | 1 (±1) | 63 (±4) | 92 (±4) | 3 (±4) | 2 (±4) | 7 (±4) | 8 (±11) |
| 120–1 | 2 (±0) | 33 (±1) | 3 (±1) | 42 (±4) | 1 (±1) | 3 (±3) | 1 (±1) |
| 120–10 | 5 (±4) | 162 (±14) | 178 (±23) | 5 (±1) | 10 (±2) | 9 (±4) | 5 (±2) |
| 120–16 | 3 (±1) | 159 (±35) | 173 (±6) | 4 (±0) | 6 (±1) | 3 (±3) | 4 (±4) |
| 120–18 | 3 (±1) | 114 (±40) | 130 (±22) | 2 (±1) | 1 (±1) | 4 (±2) | 3 (±2) |
| 120–22 | 3 (±1) | 50 (±2) | 73 (±3) | 1 (±0) | 1 (±1) | 2 (±0) | 1 (±1) |
| 123–5 | 42 (±4) | 129 (±18) | 135 (±14) | 47 (±8) | 50 (±9) | 36 (±3) | 47 (±7) |
| 123–22 | 25 (±4) | 161 (±16) | 171 (±23) | 24 (±5) | 20 (±1) | 38 (±6) | 41 (±6) |
| 147–9 | 2 (±1) | 131 (±1) | 2 (±3) | 135 (±20) | 6 (±1) | 3 (±2) | 7 (±1) |
| 147–25 | 6 (±4) | 90 (±8) | 105 (±4) | 9 (±6) | 7 (±0) | 18 (±3) | 1 (±1) |
| 156–66 | 5 (±4) | 56 (±17) | 4 (±1) | 53 (±1) | 5 (±4) | 4 (±0) | 3 (±0) |
| 157–13 | 35 (±4) | 255 (±27) | 261 (±29) | 13 (±2) | 65 (±9) | 8 (±1) | 34 (±14) |
| 157–53 | 14 (±4) | 246 (±25) | 273 (±27) | 47 (±7) | 24 (±8) | 34 (±3) | 54 (±7) |
| 157–49 | 6 (±1) | 55 (±6) | 59 (±6) | 5 (±1) | 6 (±1) | 10 (±1) | 9 (±3) |

^a Immunopurified CD4⁺ T cells were from eight seronegative HLA-DP4⁺ donors (nos. 48, 51, 119, 120, 123, 147, 156, and 157). Peptide-specific CD4⁺ T cell lines were obtained after weekly stimulations by autologous mature DC loaded with the peptide mixture (10 µg/ml each peptide). T cell lines (5 × 10³/well) were submitted to IFN-γ ELISPOT assay. They were incubated with L-DP4 cells (3 × 10³/well), with the peptide mixture or with each of the peptides (10 µg/ml) or without any peptide. In restriction control wells, L-DP4 cells were omitted and only peptide mixture and T cell lines were added. Positive responses (three times higher than background) are in bold. Experiments were performed in duplicate. n.d., Not defined.

production of spots in the presence of the peptide mixture was at least three times higher than in the absence of peptide. Stimulation with each of the peptides revealed that four peptides are T cell stimulating, namely RT 338–352, env 31–45, env 388–402, and env 620–634. More precisely, among 22 T cell lines specific for the peptide mixture, one was specific for the peptide env 620–634, two were specific for env 388–402, five were specific for env 31–45, and 15 were specific for RT 338–352. Interestingly, the latter was immunogenic for almost all of the different tested donors. Only donor 156 did not give rise to T cell lines specific for this peptide. However, only one T cell line has been derived from this donor. In sharp contrast, no T cell line was specific for the peptides Vpr 15–29 and Vpr 61–75 (data not shown). Because human-activated CD4⁺ T cells express HLA II molecules and hence are able to present peptides to surrounding T cells, we investigated for 14 peptide-specific T cell lines whether stimulation did not result from these cell contacts but required L-DP4 cells. As shown in the last column of Table III, removal of the HLA-DP4-transfected cells abolished T cell stimulation. Peptide-specific T cells were therefore restricted to HLA-DP4 molecules.

RT 338–352- and env 31–45-specific T cell lines are stimulated by native Ags presented by DCs

We then investigated the presentation of the native proteins by DCs to peptide-specific T cell lines. Due to technical constraints, it was unfortunately possible to perform these experiments only on env 31–45- and RT 338–352-specific T cell lines. Autologous immature DCs were loaded with either HIV-1 RT or Gp120 proteins, washed and incubated with each of the four T cell lines (Fig. 1, left panels). Three T cell lines (157.49, 157.13, and 157.53) were specific for the RT 338–352 peptide and were stimulated by RT-loaded DCs. They were not stimulated by DCs loaded with either Gp120 or the env 31–45 peptide. In contrast, the 156.66 T cell line was specific for the Gp120-derived peptide env 31–45 and

was stimulated by Gp120-loaded DCs. No response was observed with DCs loaded with either RT or the RT 338–352 peptide. We also evaluated the efficiency of peptide presentation using L-DP4 cells as APC and a dose range of each peptide (Fig. 1, right panels). The half-maximal stimulation of the T cell lines required a peptide concentration ranging from ~10⁻⁸ to 10⁻⁷ M. These T cells are therefore efficiently stimulated by the peptides and recognized the native Ags processed by the DCs.

RT 338–352- and env 31–45-specific T cell lines can recognize other variants besides the HXB2 sequence

To assess the influence of natural mutations on binding to HLA-DP4 and on T cell stimulation, we then investigated the sequence variations of the RT 338–352 and env 31–45 peptides. The RT 338–352 peptide is highly conserved. There are 47 variants of this peptide among the 457 sequences retrieved from the Los Alamos database. Two hundred ninety-eight sequences (65%) are identical with that of HXB2. We have submitted some of the point variants, which are among the most frequent variants, to HLA-DP4-binding assays (Table IV) and to T cell stimulation assay (Fig. 2). In agreement with the peptide-binding motif (1), only the H346 variant exhibited a lower binding capacity to HLA-DP4 molecules as compared with the RT 338–352 peptide. This loss of binding results from the unfavorable accommodation of the histidine 346 in the P6 pocket (Table IV). Two variants (R350 and R352) were stimulating for both T cell lines, whereas four variants (I348, Y346, H346, F342) were stimulating for only one of them (Fig. 2). The env 31–45 peptide is not a predominant sequence because it is found at a frequency of only 3.9%. However, its core sequence, which is delimited by residues between the P1 and P9 positions, is highly conserved and is shared by 80% of the known sequences. We therefore investigated the influence of the main sequence variation in the flanking regions. The four synthesized peptides cover 20% of the sequences (Table IV). They tightly bound to HLA-DP4

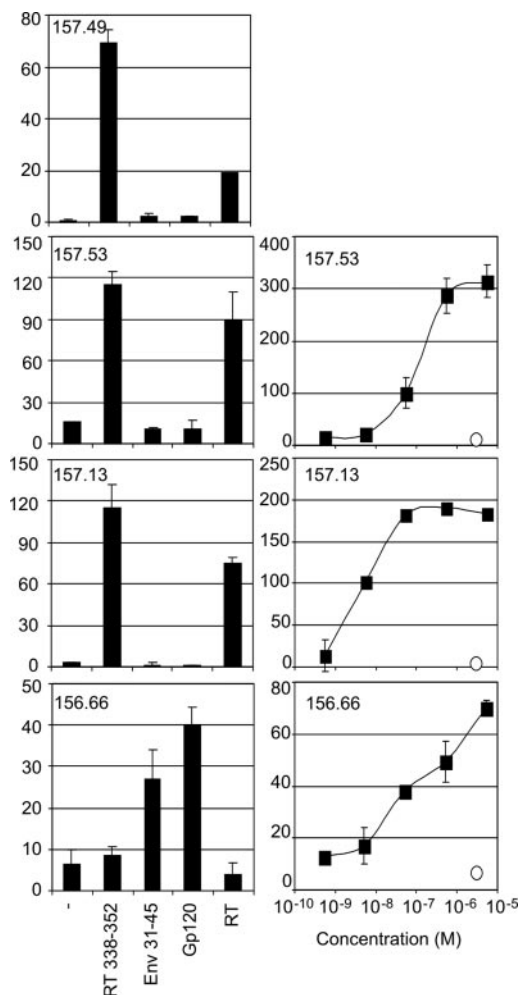


FIGURE 1. Recognition of the native proteins and the peptides env 31–45 and RT 338–352 by the peptide-specific T cell lines. T cell lines specific for env 31–45 (156.66) and RT 338–352 (157.49, 157.53, and 157.13) were obtained after three rounds of stimulations with the selected peptide mixture. *Left panels*, T cell lines (2×10^3 to 10^4 cells/well) were incubated in an IFN- γ ELISPOT assay in the presence of autologous immature DCs (2×10^4 /well) previously loaded with either recombinant RT protein or recombinant Gp120 protein or in the presence of immature autologous DCs (2×10^4 /well) with or without env 31–45 or RT 338–352 peptide ($10 \mu\text{g/ml}$). *Right panels*, T cell lines (2×10^3 to 10^4 cells/well) were incubated in an IFN- γ ELISPOT assay in the presence of L-DP4 cells (3×10^4 /well) and a dose range of peptides env 31–45 and RT 338–352 (■) or without any peptide (○). Each value represents the mean spot number of duplicates. ** and * indicate $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively.

molecules (Table III) and stimulated an env 31–45 T cell line (Fig. 2). As a result, the RT 338–352 and env 31–45 peptides elicit HLA-DP4-restricted T cells, which are able to recognize other variants besides the HXB2 sequence.

Discussion

Although HLA-DP4 molecules are the most prevalent HLA II molecules, until now HLA-DP4-restricted T cell epitopes have only been identified by chance and not in a deliberate manner. We have therefore set up an approach combining binding prediction, binding assays, and cellular assays to identify HLA-DP4-restricted T cell epitopes. This approach has been applied to the HIV genome. We identified 17 peptides that were good binders to HLA-DP401, four peptides that were T cell stimulating, and two peptides that were naturally processed epitopes of the native proteins.

In contrast to HLA-DQ molecules (35), the mode of binding to HLA-DP4 molecules relies on hydrophobic or aromatic primary anchor residues (1) and hence resembles that of HLA-DR molecules (33, 34, 36). In both HLA-DR and -DP4 molecules, the large hydrophobic P1 pocket accommodates aromatic or hydrophobic residues depending on the dimorphic residue located at position $\beta 86$. A second hydrophobic or aromatic primary anchor residue is located in the P6 pocket of HLA-DP4 molecules (1), whereas in HLA-DR molecules it is more variable in its location and nature (34, 36). One of the most successful approaches of delineation of HLA-DR-restricted T cell epitopes is the use of quantitative matrices (33, 34). We have therefore adapted this method to HLA-DP4 molecules and built quantitative matrices (M. Busson, F. A. Castelli, X.-F. Wang, W. M. Cohen, D. Charron, A. Ménez, and B. Maillère, manuscript in preparation) with the binding data recently obtained for substituted analogues of the naturally processed peptide Oxy 271–287 (1, 37). This prediction allowed us to successfully identify 17 good binders to HLA-DP401 molecules among 21 synthesized peptides. This is in agreement with the efficiency of the prediction observed on a set of unrelated peptides (M. Busson, F. A. Castelli, X.-F. Wang, W. M. Cohen, D. Charron, A. Ménez, and B. Maillère, manuscript in preparation). At a predicted threshold of 300 nM, it is estimated that we could miss 50% of the active peptides. A better coverage of the active peptides could be obtained at a threshold of 1000 nM, but it increases also the number of peptides to synthesize and the number of false positive peptides (M. Busson, F. A. Castelli, X.-F. Wang, W. M. Cohen, D. Charron, A. Ménez, and B. Maillère, manuscript in preparation). The six best peptides were submitted to in vitro CD4 $^+$ T cell-priming experiments, but other peptides with good binding IC $_{50}$ values warrant investigation for their capacity to elicit a CD4 $^+$ T cell response. This is, for instance, the case for env 483–497, env 677–691, env 684–698, RT 346–360, and RT 403–417. Primary in vitro stimulations were performed using seronegative donor CD4 $^+$ T lymphocytes cocultured with autologous native DCs loaded with the mixture of peptides to be tested. This approach has been widely used to successfully identify T cell epitopes from tumor Ags, which were introduced as immunogens in clinical trials (31, 32). It has also been applied to identification of HIV CD4 $^+$ T cell epitopes (23, 29) and used to assess immunogenicity of therapeutic proteins (38). T cell epitopes identified by these assays have been found to be immunogenic in vaccination trials of naive individuals (39) and hence are expected to contribute to the design of prophylactic vaccines. Using these assays, we found four T cell-stimulating peptides, namely RT 338–352, env 31–45, env 388–402, and env 620–634. Two of them primed CD4 $^+$ T cells that recognized the processed epitopes of the native protein. In a pioneering study, the env 30–51 peptide, which includes env 31–45, was recognized by 2 of 15 asymptomatic seropositive responders. However, these responses were not documented for their HLA class II restriction (40).

With the exception of this study, no other investigations have highlighted the four peptides we identified as CD4 $^+$ T cell epitopes, although the HLA-DP4 molecules are very frequent worldwide. Peptide screening has been performed in HIV-1 seropositive donors by evaluating the proliferative responses of peptides spanning selected HIV Ags (17, 21, 22, 24, 26). This approach has identified many CD4 $^+$ T cell epitopes. Following natural infection, CD4 $^+$ T cell response to HIV components is highly variable and generally found in long-term nonprogressor patients (19) or in individuals treated soon after infection (41). The HIV-specific CD4 $^+$ T cell response is hampered by HIV infection (13, 14) and by exhaustion of memory CD4 $^+$ T cells (16–18). The response is raised against a reduced number of components (24,

Table IV. HLA-DP4-binding capacity of HIV natural variants^a

| Peptides | Fr (%) | Sequences | | | | | | | | | | | | | | | | IC ₅₀ (nM) | |
|------------|--------|-----------|---|---|----------|---|---|----------|---|----------|---|---|----------|---|---|---|--|-----------------------|----------|
| | | 1 | | | | 4 | | | | 6 | | | | 9 | | | | DP401 | DP402 |
| Reference | | | | | | | | | | | | | | | | | | 6 (±1) | 8 (±3) |
| RT 338–352 | 65 | T | Y | Q | I | Y | Q | E | P | F | K | N | L | K | T | G | | 24 (±11) | 35 (±7) |
| F342 | 1.5 | - | - | - | - | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | 90 (±4) | 56 (±34) |
| Q345 | 0.2 | - | - | - | - | - | - | - | Q | - | - | - | - | - | - | - | | 50 (±32) | 58 (±5) |
| T345 | 0.9 | - | - | - | - | - | - | - | T | - | - | - | - | - | - | - | | 88 (±36) | 44 (±27) |
| Y346 | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | Y | - | - | - | - | - | - | | 160 (±64) | 145 (±7) |
| H346 | 2.8 | - | - | - | - | - | - | - | - | H | - | - | - | - | - | - | | >10000 | >10000 |
| I348 | 0.4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | I | - | - | - | - | | 35 (±5) | 23 (±5) |
| R350 | 0.4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | R | - | - | | 30 (±1) | 45 (±7) |
| R352 | 0.9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | R | | 55 (±23) | 35 (±0) |
| env 31–45 | 3.9 | T | E | K | L | W | V | T | V | Y | Y | G | V | P | V | W | | 6 (±0) | 29 (±18) |
| ANV | 6.6 | A | - | N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | 9 (±2) | 32 (±21) |
| AQV | 5 | A | - | Q | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | 4 (±1) | 10 (±7) |
| VGNV | 5 | V | G | N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | 10 (±5) | 36 (±2) |
| MGNV | 3 | M | G | N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | 9 (±5) | 34 (±14) |

^a Sequences were selected among the most frequent natural variants in the HIV databases (Los Alamos HIV databases). Corresponding peptides were submitted to HLA-DP4-binding assays. IC₅₀ values are expressed in nM and are the means of two to three independent experiments. Fr corresponds to the frequency of the sequence among the HIV sequences (Los Alamos HIV databases (<http://hiv-web.lanl.gov>)). The reference peptide used in these assays is the Oxy 271–287 peptide (EKKYFAATQFEPLAARL). Letters in bold correspond to residues located in the P1, P4, P6, and P9 anchor positions.

42) and varies during HIV infection (16, 26, 43). Most of the CD4⁺ T cell epitopes characterized using seropositive donors are HLA-DR-restricted (17, 21, 24). These peptides have been se-

lected as good binders to HLA-DR molecules (21), suggesting that a high affinity for HLA II molecules is a requisite to stimulate T cells upon HIV infection. Because we also selected the HLA-DP4-restricted peptides based on their binding capacities, it might be possible that they are also recognized by T lymphocytes of seropositive donors. Furthermore, priming with HLA-DP4-restricted peptides as RT 338–352 and env 31–45 gave rise to peptide-specific CD4⁺ T lymphocytes, which recognized naturally processed peptides of the native proteins. HIV-specific CD4⁺ T cell epitopes have been also delineated by repeated stimulation of seronegative PBMC with defined Ags. As an example, HIV RT protein has been used to prime CD4⁺ T lymphocytes in two different studies (27, 28). Both involved a limited numbers of naive donors and did not identify the RT 388–402 peptide. Because HLA-DP molecules are expressed less than HLA-DR molecules, we cannot exclude that upon infection or upon priming by the native Ag, the HLA-DP4-restricted T cells are poorly recruited. Nevertheless, a low priming of HLA-DP4-restricted CD4⁺ T cells during infection might be also an advantage for therapeutic vaccination because a pool of HIV-specific CD4⁺ T cells would be not affected by viremia and would be ready for priming by peptide injection. These findings should be considered for future vaccine development and cellular diagnosis.

Among the four HLA-DP4-restricted T cell-stimulating peptides we identified in this study, peptide RT 338–352 emerges as the most active. It was able to elicit 15 different T cell lines among 22 T cell lines and was immunogenic for seven naive individuals of eight investigated. This peptide is not the most active in binding to HLA-DP4 molecules, demonstrating that its T cell-stimulating ability does not entirely rely on its ability to bind to HLA-DP4 molecules. The high number of T cell lines specific for this peptide reflects the elevated number of T cell precursors able to recognize it and present in almost all naive individuals. In contrast, fewer naive precursors seem to be specific for the env 31–45, env 388–402, env 620–634 peptides, which might be less immunogenic. The four peptides we identified exhibit various degrees of conservation. Peptide RT 338–352 is common to 65% of HIV sequences, and two peptide-specific T cell lines are stimulated by other natural variants. In terms of inclusion in an epitope-based vaccine, this peptide therefore has two major advantages for a CD4 T cell epitope, namely conservation and population coverage. Its level is

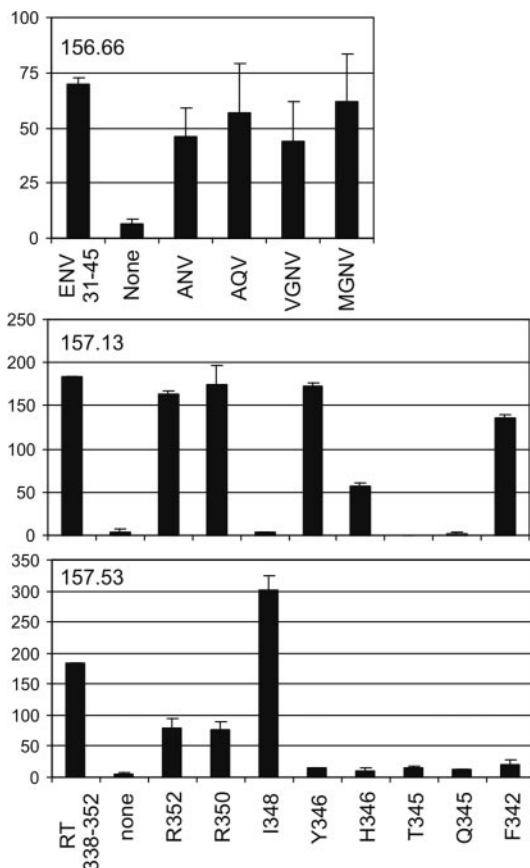


FIGURE 2. Recognition of HIV variants of the env 31–45 and RT 338–352 peptides by peptide-specific T cell lines. T cell lines specific for env 31–45 (156.66) and RT 338–352 (157.53 and 157.13) were submitted to IFN- γ ELISPOT assay. Two 10^3 to 10^4 cells/well were incubated in a IFN- γ ELISPOT assay in the presence of L-DP4 cells (3×10^4 /well) and 10 g/ml HIV peptide variants. Each bar represents the mean spot number of duplicates. ** and * indicate $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively.

comparable to that of HLA-DR-restricted CD4 T cell epitopes (21). These peptides bind to many HLA-DR molecules and are expected to exhibit binding in at least 77% of the human population (21), a frequency similar to that of HLA-DP4 molecules. In contrast to the RT peptide, there is less conservation of env peptides, especially env 388–402 and env 620–634, which have multiple variants. Peptide env 31–45 is found in only 3.9% of isolates, but its core sequence, which is delimited by residues between the P1 and P9 positions, is common to 80% of variants. We also showed that the most frequent variants stimulated one T cell line specific for the env 31–45 peptide. Moreover, as shown previously in the NY-ESO-1 tumor Ag (1, 5), it is not excluded that the HLA-DP4 peptides we identified could be also presented by HLA-DR molecules, but HLA-DR restriction has not been investigated in this study.

Altogether, we describe in this study relevant HIV sequences of interest for epitope-based vaccines and cellular diagnosis. Recent advances in the treatment of HIV infection have underscored that a broad and vigorous CD4⁺ T cell response contributes to the control of viremia (19). These observations suggest that multiple T cell epitopes should be introduced into future therapeutic HIV vaccines such as the lipopeptide mixture approach (44). HLA-DR and -DP molecules are not in genetic disequilibrium and exhibit different peptide-binding specificity. The peptides that are restricted to them are therefore expected to recruit a large repertoire of peptide-specific T cells and hence to induce a large multi-epitopic response.

Acknowledgments

We thank J. Dausset and Dr. de Toma for their gift of EBV cell lines and Dr. D. Stammers (NIBSC) for the gift of HIV-1 RT. We are also grateful to Drs. Hassan Zarour and Christine Almunia for helpful discussion.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Castelli, F. A., C. Buhot, A. Sanson, H. Zarour, S. Pouvelle-Moratille, C. Nonn, H. Gahery-Segard, J. G. Guillet, A. Menez, B. Georges, and B. Maillere. 2002. HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity. *J. Immunol.* 169: 6928–6934.
- Charron, D., R. Fauchet, E. Albert, J. Bodmer, A. Cambon-Thomsen, L. Degos, J. Hors, A. Piazza, and I. Schreuder. 1997. Genetic diversity of HLA, functional and medical implication. In *XIII International Histocompatibility Workshop and conference*. D. Charron, ed. EDK, Paris, France.
- Schultz, E. S., B. Lethé, C. L. Cambiaso, J. Van Snick, P. Chaux, J. Corthals, C. Heirman, K. Thielemans, T. Boon, and P. van der Bruggen. 2000. A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4⁺ cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res.* 60: 6272–6275.
- Zeng, G., X. Wang, P. F. Robbins, S. A. Rosenberg, and R. F. Wang. 2001. CD4⁺ T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3964–3969.
- Mandic, M., F. Castelli, B. Janjic, C. Almunia, P. Andrade, D. Gillet, V. Brusic, J. M. Kirkwood, B. Maillere, and H. M. Zarour. 2005. One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4⁺ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J. Immunol.* 174: 1633–1640.
- Schuler-Thurner, B., E. S. Schultz, T. G. Berger, G. Weinlich, S. Ebner, P. Woerl, A. Bender, B. Feuerstein, P. O. Fritsch, N. Romani, and G. Schuler. 2002. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195: 1279–1288.
- Schultz, E. S., B. Schuler-Thurner, V. Stroobant, L. Jenne, T. G. Berger, K. Thielemans, P. van der Bruggen, and G. Schuler. 2004. Functional analysis of tumor-specific Th cell responses detected in melanoma patients after dendritic cell-based immunotherapy. *J. Immunol.* 172: 1304–1310.
- Zhang, Y., N. Renkvist, Z. Sun, B. Schuler-Thurner, N. Glaichenhaus, G. Schuler, T. Boon, P. van der Bruggen, and D. Colau. 2005. A polyclonal anti-vaccine CD4 T cell response detected with HLA-DP4 multimers in a melanoma patient vaccinated with MAGE-3-DP4-peptide-pulsed dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 35: 1066–1075.
- Celis, E., and R. W. Karr. 1989. Presentation of an immunodominant T-cell epitope of hepatitis B surface antigen by the HLA-DPw4 molecule. *J. Virol.* 63: 747–752.
- Koelle, D. M., S. N. Reymond, H. Chen, W. W. Kwok, C. McClurkan, T. Gyaltsong, E. W. Petersdorf, W. Rotkis, A. R. Talley, and D. A. Harrison. 2000. Tegument-specific, virus-reactive CD4 T cells localize to the cornea in herpes simplex virus interstitial keratitis in humans. *J. Virol.* 74: 10930–10938.
- de Graaff, P. M., J. Heidema, M. C. Poelen, M. E. van Dijk, M. V. Lukens, S. P. van Gestel, J. Reinders, E. Rozeboom, M. Tilanus, P. Hoogerhout, et al. 2004. HLA-DP4 presents an immunodominant peptide from the RSV G protein to CD4 T cells. *Virology* 326: 220–230.
- Carcelain, G., P. Debre, and B. Autran. 2001. Reconstitution of CD4⁺ T lymphocytes in HIV-infected individuals following antiretroviral therapy. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 483–488.
- McNeil, A. C., W. L. Shupert, C. A. Iyasere, C. W. Hallahan, J. A. Mican, R. T. Davey, Jr., and M. Connors. 2001. High-level HIV-1 viremia suppresses viral antigen-specific CD4⁺ T cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13878–13883.
- Boritz, E., B. E. Palmer, and C. C. Wilson. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4⁺ T cells that proliferate in vitro detected in samples from most viremic subjects and inversely associated with plasma HIV-1 levels. *J. Virol.* 78: 12638–12646.
- Lichterfeld, M., D. E. Kaufmann, X. G. Yu, S. K. Mui, M. M. Addo, M. N. Johnston, D. Cohen, G. K. Robbins, E. Pae, G. Alter, et al. 2004. Loss of HIV-1-specific CD8⁺ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 200: 701–712.
- Iyasere, C., J. C. Tilton, A. J. Johnson, S. Younes, B. Yassine-Diab, R. P. Sekaly, W. W. Kwok, S. A. Migueles, A. C. Laborico, W. L. Shupert, et al. 2003. Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4⁺ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *J. Virol.* 77: 10900–10909.
- Younes, S. A., B. Yassine-Diab, A. R. Dumont, M. R. Boulassel, Z. Grossman, J. P. Routy, and R. P. Sekaly. 2003. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4⁺ T cells endowed with proliferative capacity. *J. Exp. Med.* 198: 1909–1922.
- Palmer, B. E., E. Boritz, and C. C. Wilson. 2004. Effects of sustained HIV-1 plasma viremia on HIV-1 Gag-specific CD4⁺ T cell maturation and function. *J. Immunol.* 172: 3337–3347.
- Rosenberg, E. S., J. M. Billingsley, A. M. Caliendo, S. L. Boswell, P. E. Sax, S. A. Kalams, and B. D. Walker. 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278: 1447–1450.
- Elrefaai, M., M. D. McElroy, C. P. Preas, R. Hoh, S. Deeks, J. Martin, and H. Cao. 2004. Central memory CD4⁺ T cell responses in chronic HIV infection are not restored by antiretroviral therapy. *J. Immunol.* 173: 2184–2189.
- Wilson, C. C., B. Palmer, S. Southwood, J. Sidney, Y. Higashimoto, E. Appella, R. Chesnut, A. Sette, and B. D. Livingston. 2001. Identification and antigenicity of broadly cross-reactive and conserved human immunodeficiency virus type 1-derived helper T-lymphocyte epitopes. *J. Virol.* 75: 4195–4207.
- Malhotra, U., S. Holte, S. Dutta, M. M. Berrey, E. Delpit, D. M. Koelle, A. Sette, L. Corey, and M. J. McElrath. 2001. Role for HLA class II molecules in HIV-1 suppression and cellular immunity following antiretroviral treatment. *J. Clin. Invest.* 107: 505–517.
- Venturini, S., D. E. Mosier, D. R. Burton, and P. Pognard. 2002. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag- and Gag peptide-specific CD4⁺ T-cell clones from an HIV-1-seronegative donor following in vitro immunization. *J. Virol.* 76: 6987–6999.
- Kaufmann, D. E., P. M. Bailey, J. Sidney, B. Wagner, P. J. Norris, M. N. Johnston, L. A. Cosimi, M. M. Addo, M. Lichterfeld, M. Altfeld, et al. 2004. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides. *J. Virol.* 78: 4463–4477.
- Wentworth, P. A., I. Bathurst, P. H. Feucht, H. A. Erlich, and K. S. Steimer. 1994. Epitopes recognized by HIV-SF2 nef-specific CD4⁺ T-cell clones generated from HIV-1-uninfected donors. *Vaccine* 12: 117–128.
- Malhotra, U., S. Holte, T. Zhu, E. Delpit, C. Huntsberry, A. Sette, R. Shankarappa, J. Maenza, L. Corey, and M. J. McElrath. 2003. Early induction and maintenance of Env-specific T-helper cells following human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 77: 2663–2674.
- Manca, F., D. Fenoglio, M. T. Valle, G. Li Pira, A. Kunkl, A. Ferraris, D. Saverino, F. Lancia, L. Mortara, L. Luzzi, et al. 1995. Human CD4⁺ T cells can discriminate the molecular and structural context of T epitopes of HIV gp120 and HIV p66. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 9: 227–237.
- van der Burg, S. H., K. M. Kwappenberg, A. Geluk, M. van der Kruk, O. Pontesilli, E. Hovenkamp, K. L. Franken, K. E. van Meijgaarden, J. W. Drijfhout, T. H. Ottenhoff, et al. 1999. Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4⁺ T cells by at least four unrelated HLA-DR molecules. *J. Immunol.* 162: 152–160.
- Pancrè, V., B. Georges, G. Angyalosi, F. Castelli, A. Delanoye, M. Delacré, E. Hachulla, B. Maillere, A. Bouzidi, and C. Auriault. 2002. Novel promiscuous HLA-DQ HIV Nef peptide that induces IFN- γ -producing memory CD4⁺ T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 129: 429–437.
- Texier, C., S. Pouvelle, M. Busson, M. Herve, D. Charron, A. Menez, and B. Maillere. 2000. HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. *J. Immunol.* 164: 3177–3184.
- Chaux, P., V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A. M. Eggermont, T. Boon, and P. van der Bruggen. 1999. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4⁺ T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 189: 767–778.

32. Zarour, H. M., J. M. Kirkwood, L. S. Kierstead, W. Herr, V. Brusic, C. L. Slingluff, Jr., J. Sidney, A. Sette, and W. J. Storkus. 2000. Melan-A/MART-1₅₁₋₇₃ represents an immunogenic HLA-DR4-restricted epitope recognized by melanoma-reactive CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 400–405.
33. Southwood, S., J. Sidney, A. Kondo, M. F. del Guercio, E. Appella, S. Hoffman, R. T. Kubo, R. W. Chesnut, H. M. Grey, and A. Sette. 1998. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J. Immunol.* 160: 3363–3373.
34. Sturniolo, T., E. Bono, J. Ding, L. Raddrizzani, O. Tuereci, U. Sahin, M. Braxenthaler, F. Gallazzi, M. P. Protti, F. Sinigaglia, and J. Hammer. 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices [see comments]. *Nat Biotechnol.* 17: 555–561.
35. Raddrizzani, L., T. Sturniolo, J. Guenot, E. Bono, F. Gallazzi, Z. A. Nagy, F. Sinigaglia, and J. Hammer. 1997. Different modes of peptide interaction enable HLA-DQ and HLA-DR molecules to bind diverse peptide repertoires. *J. Immunol.* 159: 703–711.
36. Rammensee, H. G., T. Friede, and S. Stevanovic. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178–228.
37. Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. 1994. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* 39: 230–242.
38. Tangri, S., B. R. Mothe, J. Eisenbraun, J. Sidney, S. Southwood, K. Briggs, J. Zinckgraf, P. Bilsel, M. Newman, R. Chesnut, et al. 2005. Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. *J. Immunol.* 174: 3187–3196.
39. Jenkins, D. E., L. L. Yasukawa, R. Bergen, C. Benike, E. G. Engleman, and A. M. Arvin. 1999. Comparison of primary sensitization of naive human T cells to varicella-zoster virus peptides by dendritic cells in vitro with responses elicited in vivo by varicella vaccination. *J. Immunol.* 162: 560–567.
40. Geretti, A. M., C. A. Van Baalen, J. C. Borleffs, C. A. Van Els, and A. D. Osterhaus. 1994. Kinetics and specificities of the T helper-cell response to gp120 in the asymptomatic stage of HIV-1 infection. *Scand. J. Immunol.* 39: 355–362.
41. Alter, G., G. Hatzakis, C. M. Tsoukas, K. Pelley, D. Rouleau, R. LeBlanc, J. G. Baril, H. Dion, E. Lefebvre, R. Thomas, et al. 2003. Longitudinal assessment of changes in HIV-specific effector activity in HIV-infected patients starting highly active antiretroviral therapy in primary infection. *J. Immunol.* 171: 477–488.
42. Peretz, Y., G. Alter, M. P. Boisvert, G. Hatzakis, C. M. Tsoukas, and N. F. Bernard. 2005. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific γ interferon secretion directed against all expressed HIV genes: relationship to rate of CD4 decline. *J. Virol.* 79: 4908–4917.
43. Pitcher, C. J., C. Quittner, D. M. Peterson, M. Connors, R. A. Koup, V. C. Maino, and L. J. Picker. 1999. HIV-1-specific CD4⁺ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat. Med.* 5: 518–525.
44. Gahery-Segard, H., G. Pialoux, B. Charmeteau, S. Sermet, H. Poncelet, M. Raux, A. Tartar, J. P. Levy, H. Gras-Masse, and J. G. Guillet. 2000. Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine. *J. Virol.* 74: 1694–1703.

Bibliographie

- [Abelev, 1971] Abelev, G. I. (1971). α -fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.*, 14 :295–358.
- [Abrams et al., 1997] Abrams, S. I., Khleif, S. N., et al. (1997). Generation of stable CD4+ and CD8+ T cell lines from patients immunized with ras oncogene-derived peptides reflecting codon 12 mutations. *Cell Immunol.*, 182(2) :137–51.
- [Abrams and Schlom, 2000] Abrams, S. I. and Schlom, J. (2000). Rational antigen modification as a strategy to upregulate or downregulate antigen recognition. *Curr. Opin. Immunol.*, 12 :85–91.
- [Acuto and Michel, 2003] Acuto, O. and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation : a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol.*, 3(12) :939–51.
- [Agrewala and Wilkinson, 1998] Agrewala, J. N. and Wilkinson, R. J. (1998). Differential regulation of Th1 and Th2 cells by p91-110 and p21-40 peptides of the 16-kD α -crystallin antigen of mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol.*, 114(3) :392–7.
- [Albert et al., 1998] Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 392(6671) :86–9.
- [Altieri, 2001] Altieri, D. (2001). The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.*, 12 :542–547.
- [Ambrosini et al., 1997] Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.*, 3 :917–21.
- [Andersen et al., 2001a] Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Capeller, B., et al. (2001a). Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.*, 61 :869–72.
- [Andersen et al., 2001b] Andersen, M. H., Pedersen, L. O., et al. (2001b). Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res.*, 61 :5964–8.
- [Andersson et al., 1994] Andersson, G., Andersson, L., et al. (1994). Simplifying Genetic Locus Assignment of HLA-DRB genes. *Immunol today*, 15(2) :58–62.
- [Arnold et al., 2002] Arnold, P., La Gruta, N., Miller, T., et al. (2002). The majority of immunogenic epitopes generate CD4+ T cells that are dependent on MHC class II-bound peptide-flanking residues. *The Journal of Immunology*, 169 :739–749.

- [Ash et al., 1990] Ash, R., Casper, J., Chitambar, C., et al. (1990). Successful allogeneic transplantation of T-cell depleted bone marrow from closely HLA-matched unrelated donors. *N Engl J Med*, 322 :485.
- [Ashkenazi and Dixit, 1998] Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). Death receptors : signaling and modulation. *Science*, 281(5381) :1305–8.
- [Austin et al., 1985] Austin, P., trowsdale, J., Rudd, C., et al. (1985). Functional expression of HLA-DP genes transfected into mouse fibroblasts. *Nature*, 313(5997) :61–4.
- [Ayyoub et al., 1999] Ayyoub, M., Mazarguil, H., Monsarrat, B., et al. (1999). A structure-based approach to designing non-natural peptides that can activate anti-melanoma cytotoxic T cells. *J Biol Chem*, 274 :10227–34.
- [Ayyoub et al., 2001] Ayyoub, M., Migliaccio, M., Guillaume, P., et al. (2001). Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur J Immunol*, 31 :2642–51.
- [Banchereau and Palucka, 2001] Banchereau, J. and Palucka, A. K. (2001). Immune and clinical response in patients with metastatic melanoma to CD34+ progenitor derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.*, 61(17) :6451–8.
- [Banchereau and Palucka, 2005] Banchereau, J. and Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancers. *Nature*, 5 :296–306.
- [Banchereau and Steinman, 1998] Banchereau, J. and Steinman, R. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392 :245–252.
- [Barry and Bleackley, 2002] Barry, M. and Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes : all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*, 2(6) :401–9.
- [Baselmans et al., 2000] Baselmans, P. J., Pollabauer, E., van Reijssen, F. C., et al. (2000). IgE production after antigen-specific and cognate activation of HLA-DPw4-restricted T-cell clones, by 78% of randomly selected B-cell donors. *Hum Immunol.*, 61(8) :789–98.
- [Baskar et al., 1995] Baskar, S., Glimcher, L., Nabavi, N., et al. (1995). Major histocompatibility complex class II+ B7-1+ tumor cells are potent vaccines for stimulating tumor rejection in tumor-bearing mice. *J. Exp. Med.*, 181 :619–29.
- [Begovich et al., 2001] Begovich, A. B., Moonsamy, P. V., Mack, S. J., et al. (2001). Genetic variability and linkage disequilibrium within the HLA-DP region : analysis of 15 different populations. *tissue Antigens*, 57(5) :424–39.
- [Belli et al., 2002] Belli, F., testori, A., Rivoltini, L., et al. (2002). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein peptidecomplex-96 (oncophage) : clinical and immunological findings. *J Clin Oncol.*, 20(20) :4169–80.
- [BenMohamed et al., 2003] BenMohamed, L., Bertrand, G., McNamara, C., et al. (2003). Identification of novel immunodominant CD4+ Th1-type T-cell peptide epitopes from herpes simplex virus glycoprotein D that confer protective immunity. *Journal of Virology*, 77(17) :9463–73.

- [Bennett et al., 1998] Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., et al. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling [see comments]. *Nature*, 393(6684) :478–80.
- [Berger et al., 2002] Berger, C., Knutson, K., Salazar, L., et al. (2002). Peptide-based vaccines. Technical report, Oncology, University of Washington, Seattle, Washington.
- [Berretta et al., 2003] Berretta, F., Butler, R., Diaz, G., et al. (2003). Detailed analysis of the effects of glu/lys β 69 human leukocyte antigen-DP polymorphism on peptide-binding specificity. *tissue Antigens*, 62(6) :459–71.
- [Berzofsky et al., 2004] Berzofsky, J., terabe, M., Oh, S., et al. (2004). Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J. Clin. Invest.*, 113 :1515–1525.
- [Bian et al., 2003] Bian, H., Reidhaar-Olson, J., and Hammer, J. (2003). The use of bioinformatics for identifying class II-restricted T-cell epitopes. *Methods*, 29 :299–309.
- [Bicknell et al., 1994] Bicknell, D., Rowan, A., and Bodmer, W. (1994). β_2 -microglobulin gene mutations : a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(11) :4751–5.
- [Bikoff et al., 1993] Bikoff, E. K., Huang, L. Y., Episkopou, V., et al. (1993). Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J Exp Med*, 177(6) :1699–712.
- [Binder et al., 2000] Binder, R., Han, D., and Srivastava, P. (2000). CD91 : A receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol*, 1 :151–155.
- [Bjorkman et al., 1987] Bjorkman, P. J., Saper, M. A., et al. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329 :506–12.
- [Bocchia et al., 2000] Bocchia, M., Bronte, V., Colombo, M., et al. (2000). Antitumor vaccination : where we stand. *Haematologica*, 85 :1172–1206.
- [Bocchia et al., 2005] Bocchia, M., Gentili, S., Abruzzese, E., et al. (2005). Effect of a p210 multi-peptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease : a multicentre observational trial. *Lancet*, 365 :657–62.
- [Boczkowski et al., 1996] Boczkowski, D., Nair, S., Snyder, D., et al. (1996). Determinants and mechanisms of human immune responses to bee venom phospholipase A2. *J Exp Med*, 184 :465–472.
- [Boel et al., 1995] Boel, P., Wildmann, C., Sensi, M., et al. (1995). BAGE : a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity*, 2 :167–75.
- [Boise et al., 1995] Boise, L., Minn, A., Noel, P., et al. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*, 3(1) :97–98.
- [Boon et al., 1994] Boon, T., Coulie, P., Marchand, M., et al. (1994). Genes coding for tumor rejection antigens – perspectives for specific immunotherapy. *Important Adv Oncol.*, 130(1) :53–69.

- [Boon et al., 1997] Boon, T., Coulie, P., and Van den Eynde, B. (1997). Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol today*, 18 :267–8.
- [Boon et al., 2006] Boon, T., Coulie, P., Van den Eynde, B., et al. (2006). Human T cell responses against melanoma. *Annu. Rev. Immunol.*, 24 :175–208.
- [Boon et al., 1992] Boon, T., De Plaen, E., Lurquin, C., et al. (1992). Identification of tumour rejection antigens recognized by T lymphocytes. *Cancer Surv.*, 13 :23–37.
- [Boonstra et al., 2003] Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gillet, M., et al. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development : dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med*, 197(1) :101–9.
- [Bosch et al., 1996] Bosch, G., Joosten, A., and Kessler, J. (1996). Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood*, 88(9) :3522–7.
- [Brandle et al., 1996] Brandle, D., Brasseur, F., and Weynants, P. (1996). A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med.*, 183(6) :2501–8.
- [Brown et al., 1993] Brown, J. H., Jardetzky, T. S., et al. (1993). Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1. *Nature*, 364(6432) :33–9.
- [Brusic et al., 1998] Brusic, V., Honeyman, G., Hammer, J., et al. (1998). Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural network. *Bioinformatics*, 14 :1171–4.
- [Bugawan et al., 1990] Bugawan, T. L., Begovich, A. B., and Erlich, H. A. (1990). Rapid HLA-DPB typing using enzymatically amplified DNA and nonradioactive sequence-specific oligonucleotide probes. *Immunogenetics*, 32(4) :231–41.
- [Burnet, 1957] Burnet, F. (1957). Cancer : a biological approach. *Br Med J.*, 1 :779–86.
- [Burnet, 1967] Burnet, F. M. (1967). Immunological aspects of malignant disease. *Lancet*, 1(7501) :1171–4.
- [Casati et al., 2003] Casati, C., Dalerba, P., Rivoltini, L., et al. (2003). The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res.*, 63(15) :4507–15.
- [Castelli et al., 2002] Castelli, F. A., Buhot, C., Sanson, A., et al. (2002). HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity. *J Immunol*, 169(12) :6928–34. 0022-1767 Journal Article.
- [Castellino and Germain, 1995] Castellino, F. and Germain, R. (1995). Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity*, 2(1) :73–88.

- [Castellino et al., 1997] Castellino, F., Zhong, G., and Germain, R. (1997). Antigen presentation by MHC class II molecules : Invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol*, 54(2) :159–69.
- [Celis et al., 1988] Celis, E., Karr, R., Dietzschold, B., et al. (1988). Genetic restriction and fine specificity of human T cell clones reactive with rabies virus. *J Immunol.*, 141(8) :2721–8.
- [Celis and Karr, 1989] Celis, E. and Karr, R. W. (1989). Presentation of an immunodominant T-cell epitope of hepatitis b surface antigen by the HLA-DPw4 molecule. *J Virol*, 63(2) :747–52.
- [Celis et al., 1990] Celis, E., Larson, J., Otvos, L., et al. (1990). Identification of a rabies virus T cell epitope on the basis of its similarity with a hepatitis b surface antigen peptide presented to T cells by the same MHC molecule (HLA-DPw4). *J Immunol*, 145(1) :305–10.
- [Celis et al., 1994] Celis, E., tsai, V., Crimi, C., et al. (1994). Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91 :2105–9.
- [Chambers et al., 2001] Chambers, C., Kuhns, M., Egen, J., et al. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses : mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol*, 19 :565–94.
- [Chang et al., 2002] Chang, A., Redman, B., Whitfield, J., et al. (2002). A phase I trial of tumor lysate-pulseddendritic cells in the treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 8 :1021–32.
- [Chang et al., 2000] Chang, W. L., Audet, R. G., Aizenstein, B. D., et al. (2000). T-Cell Epitopes and Human Leukocyte Antigen Restriction Elements of an Immunodominant Antigen of *Blastomyces Dermatitidis*. *Infect Immun.*, 68(2) :502–10.
- [Chauhan et al., 1996] Chauhan, B., Knutsen, A., Hutcheson, P. S., et al. (1996). T cell subsets, epitope mapping, and HLA-restriction in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Clin Invest.*, 97(10) :2324–31.
- [Chaux et al., 1999] Chaux, P., Vantomme, V., Stroobant, V., et al. (1999). Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes. *J Exp Med*, 189(5) :767–78.
- [Chen et al., 1996] Chen, H., Gabrilovich, D., tamp  , R., et al. (1996). A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet*, 13(2) :210–3.
- [Chicz et al., 1997] Chic  , R., Graziano, D., tru  co, M., et al. (1997). HLA-DP2 : Self peptide sequences and binding properties. *J Immunol*, 159(10) :4935–42.
- [Chicz et al., 1992] Chic  , R. M., Urban, R. G., et al. (1992). Predominant Naturally Processed Peptides Bound to HLA-DR1 are Derived from MHC-Related Molecules and are Heterogeneous in Size. *Nature*, 358(6389) :764–8.
- [Chicz et al., 1993] Chic  , R. M., Urban, R. G., et al. (1993). Specificity and Promiscuity among Naturally Processed Peptides Bound to HLA-DR Alleles. *J Exp Med*, 178(1) :27–47.

- [Chinnaiyan et al., 1995] Chinnaiyan, A., O'Rourke, K., tewari, M., et al. (1995). FADD, a novel death domaincontaining protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *cell*, 81(4) :505–12.
- [Chouaib et al., 2001] Chouaib, S., Echchakir, H., et al. (2001). Technological advances in immuno-oncology : from fundamental concepts to patient immunological monitoring. *Bull Cancer*, 88 :733–40.
- [Cibotti et al., 1994] Cibotti, R., Kanellopoulos, J., Cabaniols, J., et al. (1994). Public and private V β T cell receptor repertoires against hen egg white lysozyme HEL in nontransgenic versus hel transgenic mice. *J Exp Med.*, 180(3) :861–72.
- [Cochlovius et al., 2000] Cochlovius, B., Stassar, M., Christ, O., et al. (2000). In vitro and in vivo induction of a Th cell response toward peptides of the melanoma-associated glycoprotein 100 protein selected by the tepitope program. *J Immunol*, 165(8) :4731–41.
- [Cohen et al., 2005] Cohen, C., Zheng, Z., Bray, R., et al. (2005). Recognition of fresh human tumor by human peripheral blood lymphocytes transduced with a bicistronic retroviral vector encoding a murine anti-p53 tcr. *J Immunol*, 175 :5799–5808.
- [Cohen et al., 2006] Cohen, W., Pouvelle-Moratille, S., Wang, X., et al. (2006). Scanning the HIV genome for CD4 T cell epitopes restricted to HLA-DP4, the most prevalent hla class II molecule. *J Immunol*, 176 :5401–5408.
- [Coley, 1991] Coley, W. B. (1991). The treatement of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop*, 262 :792–94.
- [Colombani, 1993] Colombani, J. (1993). *HLA : Fonctions Immunitaires at Applications Médicales*. Eds. John Libbey Eurotext.
- [Colonna and Samaridis, 1995] Colonna, M. and Samaridis, J. (1995). Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*, 268(5209) :405–8.
- [Consogno et al., 2003] Consogno, G., Manici, S., Facchinetti, V., et al. (2003). Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+T-cell epitopes on the tumor antigenMAGE-3. *blood*, 101(3) :1038–1044.
- [Cormier et al., 1997] Cormier, J., Salgaller, M., Prevette, T., et al. (1997). Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan-A. *Cancer J Sci Am.*, 3(1) :37–44.
- [Correale et al., 1997] Correale, P., Walmsley, K., Nieroda, C., et al. (1997). In vitro generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst.*, 89(4) :293–300.
- [Costello et al., 1999] Costello, R., Gastaut, J., and Olive, D. (1999). Tumor escape from immune surveillance. *Archivum Immunologiae et therapiae Experimentalis*, 47 :83–88.

- [Coulie et al., 1995] Coulie, P., Lehmann, F., Lethe, B., et al. (1995). A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(17) :7976–80.
- [Cox et al., 1994] Cox, A., Skipper, J., Chen, Y., et al. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*, 264(5159) :716–9.
- [Coyle et al., 2000] Coyle, A., Lehar, S., Lloyd, C., et al. (2000). The CD28-related molecule icos is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity*, 13(1) :95–105.
- [Cresswell, 1992] Cresswell, P. (1992). Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr Opin Immunol*, 4(1) :87–92.
- [Cresswell, 1996] Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*, 84(4) :505–7.
- [Cucca et al., 2001] Cucca, F., Dudbridge, F., Loddo, M., et al. (2001). The HLA-DPb1-associated component of the IDDM1 and its relationship to the major loci HLA-DQB1, -DQA1, and -DRB1. *Diabetes*, 50 :1200–1205.
- [Cui et al., 1997] Cui, J., Shin, T., Kawano, T., et al. (1997). Requirement for valpha 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science*, 278(5343) :1623–6.
- [Dahl et al., 1996] Dahl, A., Beverley, P., and Stauss, H. (1996). A synthetic peptide derived from the tumor-associated protein mdm2 can stimulate autoreactive, high avidity cytotoxic T lymphocytes that recognize naturally processed protein. *J Immunol*, 157 :239–46.
- [Daugas et al., 2000] Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., et al. (2000). Apoptosis-inducing factor AIF : a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*, 476(3) :118–23.
- [Davenport et al., 1995] Davenport, M. P., Quinn, C. L., Chicz, R. M., et al. (1995). Naturally processed peptides from two disease-resistance-associated HLA-DR13 alleles show related sequence motifs and the effects of the dimorphism at position 86 of the HLA-DR β chain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(14) :6567–71.
- [Davis et al., 2004] Davis, I., Chen, W. Jackson, H. P. P., et al. (2004). Recombinant NY-ESO-1 protein with iscomatrix adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(29) :10697–702.
- [de Graaff et al., 2004] de Graaff, P., Heidema, J., Poelen, M., et al. (2004). HLA-DP4 presents an immunodominant peptide from the rsv g protein to CD4 T cells. *Virologie*, 326 :220–30.
- [de Lalla et al., 1999] de Lalla, C., Sturniolo, T., Abbruzzese, L., et al. (1999). Cutting edge : Identification of novel T cell epitopes in lol p5a by computational prediction. *J Immunol*, 163(4) :1725–9.
- [De Plaen et al., 1994] De Plaen, E., Arden, K., traversari, C., et al. (1994). Structure chromosomal localization and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40 :360–369.
- [De Plaen et al., 1997] De Plaen, E., Lurquin, C., Lethe, B., et al. (1997). Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods*, 12(2) :125–142.

- [de Witte et al., 2006] de Witte, M., Coccoris, M., Wolkers, M., et al. (2006). Targeting self antigens through allogeneic tcr gene transfer. *Blood*, 180 :870–877.
- [Delneste et al., 2002] Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., et al. (2002). Involvement of lox-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity*, 17(3) :353–62.
- [Delon and Germain, 2000] Delon, J. and Germain, R. N. (2000). Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol*, 10(24) :R923–33.
- [Dengjel et al., 2005] Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., et al. (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(22) :7922–7.
- [Diefenbach et al., 2000] Diefenbach, A., Jamieson, A., Liu, S., et al. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor : expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol.*, 1(2) :119–26.
- [Dighe et al., 1994] Dighe, A., Richards, E., Old, L., et al. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1 :447–56.
- [Dong et al., 1995] Dong, R. P., Kamikawaji, N., Toida, N., et al. (1995). Characterization of T cell epitopes restricted by HLA-DP9 in streptococcal M12 protein. *J Immunol*, 154(9) :4536–45.
- [Duan et al., 1999] Duan, Z., Feller, A. J., toh, H. C., et al. (1999). TRAG-3, a novel gene, isolated from a taxol-resistant ovarian carcinoma cell line. *Gene*, 229 :75–81.
- [Duhra and Ilchyshyn, 1991] Duhra, P. and Ilchyshyn, A. (1991). Prolonged survival in metastatic malignant melanoma associated with vitiligo. *Clin Exp Dermatol*, 16 :303–305.
- [e Sousa, 2001] e Sousa, R. C. (2001). Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity*, 14 :495–498.
- [Echchakir et al., 2000] Echchakir, H., Bagot, M., Dorothee, G., et al. (2000). Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J Invest Dermatol*, 115(1) :74–80.
- [Eckels et al., 1983] Eckels, D., Lake, P., Lamb, J., et al. (1983). SB-restricted presentation of influenza and herpes simplex virus antigens to human T-lymphocyte clones. *Nature*, 301(5902) :716–8.
- [Egen and Allison, 2002] Egen, J. G. and Allison, J. P. (2002). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*, 16(1) :23–35.
- [Elliott et al., 1994] Elliott, E., DRake, J., Amigorena, S., et al. (1994). The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med*, 179(2) :681–94.
- [Engelhard et al., 2002] Engelhard, V., Bullock, T., Colella, T., et al. (2002). Antigens derived from melanocyte differentiation proteins : self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*, 188(2) :136–46.

- [Erlich et al., 1996] Erlich, H., Rotter, J., Chang, J., et al. (1996). Association of HLA-DPB1*0301 with insulin dependent diabetes mellitus in mexican-americans. *Diabetes*, 45 :610–614.
- [Falk et al., 1994] Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., et al. (1994). Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics*, 39(4) :230–42. Using Smart Source Parsing.
- [Fehervari and Sakaguchi, 2004] Fehervari, Z. and Sakaguchi, S. (2004). CD4+ Tregs and immune control. *Clin Exp Allergy*, 114(9) :1209–17.
- [Ferrara and Deeg, 1991] Ferrara, J. and Deeg, H. (1991). Graft-versus-host disease. *N Engl J Med.*, 324(10) :667–74.
- [Fisk et al., 1995] Fisk, B., Blevins, T. L., Wharton, J. T., et al. (1995). Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med*, 181 :2109–17.
- [Fleischhauer et al., 2001] Fleischhauer, K., Zino, E., Mazzi, B., et al. (2001). Peripheral blood stem cell allograft rejection mediated by CD41 T lymphocytes recognizing a single mismatch at HLA-DPB1*0901. *Blood*, 98 :1122–26.
- [Flynn and Stockinger, 2003] Flynn, S. and Stockinger, B. (2003). Tumor and CD4 T-cell interactions : tumor escape as result of reciprocal inactivation. *Blood*, 101(11) :4472–8.
- [Foley et al., 1997] Foley, P., Lympany, P., Puscinska, E., et al. (1997). HLA-DPB1 and TAP1 polymorphisms in sarcoidosis. *Chest*, 111(suppl) :73S.
- [Fong et al., 2001a] Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., et al. (2001a). Dendritic cell-based xenantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol*, 167 :7150–7156.
- [Fong and Engleman, 2000] Fong, L. and Engleman, E. (2000). Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.*, 18 :245–273.
- [Fong et al., 2001b] Fong, L., Hou, Y., Rivas, A., et al. (2001b). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 :8809–8814.
- [Fossum et al., 1993] Fossum, B., Gedde-Dahl, T., Hansen, T., et al. (1993). Overlapping epitopes encompassing a point mutation (12 Gly→Arg) in p21 ras can be recognized by HLA-DR, -DP and -DQ restricted T cells. *Eur J Immunol.*, 23(10) :2687–91.
- [Franksson et al., 1993] Franksson, L., George, E., Powis, S., et al. (1993). Tumorigenicity conferred to lymphoma mutant by major histocompatibility complex-encoded transporter gene. *J Exp Med.*, 177(1) :201–5.
- [Fremont et al., 1992] Fremont, D. H., Matsuinura, M., et al. (1992). Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science*, 257 :919–27.
- [Frost et al., 1997] Frost, P., Ng, C., Beldegrun, A., et al. (1997). Immunosenitization of prostate carcinoma cell lines for lymphocytes (CTL, TIL, LAK)-mediated apoptosis via the Fas-Fas-ligand pathway of cytotoxicity. *Protein Eng*, 10 :70–83.

- [Fukazawa et al., 2000] Fukazawa, T., Kikuchi, S. and, S. H., et al. (2000). Genomic HLA profiles of ms in hokkaido, japan : important role of DPB1*0501 allele. *J Neurol*, 247 :175–8.
- [Gammon et al., 1987] Gammon, G., Shastri, N., Cogswell, J., et al. (1987). The choice of T-cell epitopes utilized on a protein antigen depends on multiple factors distant from, as well as at the determinant site. *Immunol Rev*, 98 :53–73.
- [Gao et al., 2002] Gao, F., Khammanivong, V., Liu, W., et al. (2002). Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell. *Cancer Res*, 62(22) :6438–41.
- [Gaschet et al., 1998] Gaschet, J., Gallot, G., and Ibisch, C. (1998). Acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation with a single HLA-DPB1*1001 mismatch : involvement of different tcryb subsets. *Bone Marrow transplant.*, 22 :385–392.
- [Gaschet et al., 1996a] Gaschet, J., Lim, A., Liem, L., et al. (1996a). Acute graft versus host disease due to T lymphocytes recognizing a single HLA-DPB1*0501 mismatch. *J Clin Invest*, 98(1) :100–7.
- [Gaschet et al., 1993] Gaschet, J., Mahe, B., and Milpied, N. (1993). Specificity of T cells invading the skin during acute graft-versus-host disease after semiallogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest*, 91 :12–20.
- [Gaschet et al., 1996b] Gaschet, J., trevino, M., Cherel, M., et al. (1996b). HLA-target antigens and T-cell receptor diversity of activated T cells invading the skin during acute graft-versus-host disease. *Blood*, 87(6) :2345–53.
- [Gaston et al., 1997] Gaston, J., Goodall, J., Young, J., et al. (1997). Effect of polymorphism of theHLA-DPa1 chain on presentation of antigenic peptides. *Hum Immunol.*, 54(1) :40–7.
- [Gaston et al., 1991] Gaston, J. S., Life, P. F., van der Zee, R., et al. (1991). Epitope specificity and MHC restriction of rheumatoid arthritis synovial T cell clones which recognize a mycobacterial 65 kda heat shock protein. *Int Immunol*, 3(10) :965–72.
- [Gedde-Dahl et al., 1992] Gedde-Dahl, t., Eriksen, J., thorsby, E., et al. (1992). T-cell responses against products of oncogenes : generation and characterization of human tcell clones specific for p21 ras-derived synthetic peptides. *Hum Immunol.*, 33(4) :266–74.
- [Geluk et al., 1992] Geluk, A., Van Meijgaarden, K. E., Janson, A. A., et al. (1992). Functional analysis of DR17(DR3)-restricted mycobacterial T cell epitopes reveals DR17-binding motif and enables the design of allele- specific competitor peptides. *J Immunol*, 149(9) :2864–71.
- [Germain, 1994] Germain, R. N. (1994). MHC-Dependent Antigen Processing and Peptide Presentation : Providing Ligands for T Lymphocyte Activation. *Cell*, 76(2) :287–99.
- [Ghosh et al., 1995] Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E., et al. (1995). The structure of an intermediate in class II MHC maturation : Clip bound to HLA-DR3. *Nature*, 378(6556) :457–62.
- [Gillespie and Coleman, 1999] Gillespie, A. and Coleman, R. (1999). The potential of melanoma antigen expression in cancer therapy. *Cancer treatment Reviews*, 25 :219–27.

- [Giuntoli et al., 2002] Giuntoli, R., Lu, J., Kobayashi, H., et al. (2002). Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potentiate their proliferation, survival, and effector function. *Clin Cancer Res*, 8(3) :922–31.
- [Gjersten et al., 2001] Gjersten, M. K., Buanes, T., Rosseland, A. R., et al. (2001). Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony- stimulating factor as adjuvant : Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 92(3) :441–50.
- [Gjertsen et al., 2001] Gjertsen, M., Buanes, T., Rosseland, A., et al. (2001). Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony- stimulating factor as adjuvant : Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 92 :441–50.
- [Glennie and Johnson, 2000] Glennie, M. J. and Johnson, P. W. (2000). Clinical trials of antibody therapy. *Immunol today*, 21(8) :403–10.
- [Gnjatic et al., 1988] Gnjatic, S., Atanackovic, D., Jager, E., et al. (1988). Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients : correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci*, 100(15) :8862–7.
- [Gnjatic et al., 1998] Gnjatic, S., Cai, Z., Viguier, M., et al. (1998). Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53 epitope presented by breast carcinomas and melanomas. *J Immunol*, 160(1) :328–33.
- [Godfrey et al., 2000] Godfrey, D., Hammond, K., Poulton, L., et al. (2000). NKT cells : facts, functions and fallacies. *Immunol today*, 21(11) :573–83.
- [Godfrey et al., 2004] Godfrey, D., MacDonald, H., Kronenberg, M., et al. (2004). NKT cells : what's in a name? *Nat Rev Immunol.*, 4(3) :231–7.
- [Gold and Freedman, 1963] Gold, P. and Freedman, S. O. (1963). Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.*, 121 :439–62.
- [Graff-Dubois et al., 2002] Graff-Dubois, S., Faure, O., Gross, D., et al. (2002). Generation of ctl recognizing an hla-a*0201-restricted epitope shared by mage-a1, -a2, -a3, -a4, -a6, -a10, and -a12 tumor antigens : Implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol*, 169 :575–580.
- [Green et al., 1994] Green, J., Noel, P., Sperling, A., et al. (1994). Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity*, 1(6) :501–8.
- [Green et al., 1993] Green, S., Kurane, I., Edelman, R., et al. (1993). Dengue virus-specific human CD4+ T-lymphocyte responses in a recipient of an experimental live-attenuated dengue virus type 1 vaccine : bulk culture proliferation, clonal analysis, and precursor frequency determination. *J Virol.*, 67(10) :5962–7.
- [Griffiths and Isaaz, 1993] Griffiths, G. M. and Isaaz, S. (1993). Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J Cell Biol*, 120(4) :885–96.

- [Gross, 1943] Gross, L. (1943). Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res.*, 3 :326–33.
- [Groux et al., 1997] Groux, H., O’Garra, A., Bigler, M., et al. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652) :737–42.
- [Guttinger et al., 1991] Guttinger, M., Romagnoli, P., Vandel, L., et al. (1991). HLA polymorphism and T cell recognition of a conserved region of p190, a malaria vaccine candidate. *Int Immunol.*, 3(9) :899–906.
- [Hammer et al., 1994a] Hammer, J., Belunis, C., Bolin, D., et al. (1994a). High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(10) :4456–60.
- [Hammer et al., 1994b] Hammer, J., Bono, E., Gallazzi, F., et al. (1994b). Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J Exp Med*, 180(6) :2353–8.
- [Hammer et al., 1995] Hammer, J., Gallazzi, F., Bono, E., et al. (1995). Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules : Correlation with rheumatoid arthritis association [see comments]. *J Exp Med*, 181(5) :1847–55.
- [Hammer et al., 1997] Hammer, J., Sturniolo, T., and Sinigaglia, F. (1997). HLA class II peptide binding specificity and autoimmunity. *Adv Immunol*, 66 :67–100. Using Smart Source Parsing.
- [Hammer et al., 1992] Hammer, J., takacs, B., and Sinigaglia, F. (1992). Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using m13 display libraries. *J Exp Med*, 176(4) :1007–13.
- [Hammer et al., 1993] Hammer, J., Valsasnini, P., tolba, K., et al. (1993). Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell*, 74(1) :197–203.
- [Harrington et al., 2006] Harrington, L., Mangan, P., and Weaver, C. (2006). Expanding the effector cd4 t-cell repertoire : the th17 lineage. *Curr Opin Immunol.*, 18 :349–356.
- [Hashimoto et al., 1995] Hashimoto, W., takeda, K., Anzai, R., et al. (1995). Cytotoxic NK1.1 Ag⁺ alpha beta T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J Immunol*, 154(9) :4333–40.
- [Hassainya et al., 2005] Hassainya, Y., Garcia-Pons, F., Kratzer, R., et al. (2005). Identification of naturally processed HLA-A2 restricted proinsulin epitopes by reverse immunology. *Diabetes*, 54 :2053–2059.
- [Heiser et al., 2002] Heiser, A., Coleman, D., Dannull, J., et al. (2002). Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest*, 109 :409–417.
- [Helgason et al., 1992] Helgason, C., Prendergast, J., Berke, G., et al. (1992). Peritoneal exudate lymphocyte and mixed lymphocyte culture hybridomas are cytolytic in the absence of cytotoxic cell proteinases and perforin. *Eur J Immunol*, 22(12) :3187–90.

- [Hermann et al., 1992] Hermann, E., Mayet, W., thomssen, H., et al. (1992). HLA-DP restricted chlamydia trachomatis specific synovial fluid T cell clones in chlamydia induced reiter's disease. *J Rheumatol.*, 19(8) :1243–6.
- [Higgins et al., 1992] Higgins, J. A., Lamb, J. R., Marsh, S. G., et al. (1992). Peptide-induced nonresponsiveness of HLA-DP restricted human T cells reactive with dermatophagoides spp. (house dust mite). *J Allergy Clin Immunol*, 90(5) :749–56.
- [Higgins et al., 1994] Higgins, J. A., thorpe, C. J., Hayball, J. D., et al. (1994). Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of Dermatophagoides species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. *J Allergy Clin Immunol.*, 93(5) :891–9.
- [Hohn et al., 1999] Hohn, H., Pilch, H., Gunzel, S., et al. (1999). CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR- restricted peptides provided by human papillomavirus-e7. *J Immunol*, 163(10) :5715–22.
- [Hoos and Levey, 2003] Hoos, A. and Levey, D. (2003). Vaccination with heat shock protein-peptide complexes : from basic science to clinical applications. *Expert Rev Vaccines*, 2(3) :369–79.
- [Hows et al., 1986] Hows, J., Yin, J., Marsh, J., et al. (1986). Histocompatible unrelated volunteer donors compared with hla nonidentical family donors in marrow transplantation for aplastic anemia and leukemia. *Blood*, 68 :1322.
- [Hughes et al., 2005] Hughes, M., Yu, Y., Dudley, M., et al. (2005). Transfer of a tcr gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active t cell effector functions. *Hum. Gene Ther.*, 16 :457–72.
- [Hung et al., 1998] Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., et al. (1998). The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*, 188(612) :2357–68.
- [Huppa and Davis, 2003] Huppa, J. B. and Davis, M. M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*, 3(12) :973–83.
- [Ichiki et al., 2005] Ichiki, Y., Hanagiri, T., takenoyama, M., et al. (2005). Tumor specific expression of survivin-2B in lung cancer as a novel target of immunotherapy. *Lung Cancer.*, 48(2) :281–9.
- [Igney and Krammer, 2002] Igney, F. and Krammer, P. (2002). Immune escape of tumors : apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of Leukocyte Biology*, 71 :907–920.
- [Ikeda et al., 1999] Ikeda, H., Matsushita, M., and Kawakami, H. (1999). PRAME protein expressed in leukemia cells as a target molecule for immunotherapy. *Rinsho Ketsueki.*, 40(6) :484–6.
- [Itoh et al., 1996] Itoh, K., Hayashi, A., Nakao, M., et al. (1996). Human tumor rejection antigens-MAGE. *J. Biochem*, 119(3) :385–390.
- [Itoh and Platsoucas, 1988] Itoh, K. and Platsoucas, C. D. (1988). Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor. *J Exp Med*, 168(4) :1419–41.
- [Itoh and Nagata, 1993] Itoh, N. and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. mutational analysis of human fas antigen. *J Biol Chem*, 268(15) :10932–7.

- [Jaeger et al., 1996] Jaeger, E., Bernhard, H., Romero, P., et al. (1996). Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo : implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer*, 66(2) :162–9.
- [Jager et al., 2000] Jager, E., Gnjjatic, S., Nagata, Y., et al. (2000). Induction of primary NY-ESO-1 immunity : CD8⁺ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 :12198–203.
- [Janeway, 2001] Janeway, C. (2001). *Immunobiology : the immune system in health and disease*. New York, NY, US, Garland Pub, London.
- [Janjic et al., 2006] Janjic, B., AnDRade, P., Wang, X., et al. (2006). Spontaneous CD4⁺ T cell responses against TRAG-3 in patients with melanoma and breast cancers. *J Immunol.*, 177(4) :2717–27.
- [Jardetzky et al., 1994] Jardetzky, T. S., Brown, J. H., et al. (1994). Three-Dimensional Structure of a Human Class II Histocompatibility Molecule Complexed with Superantigen. *Nature*, 368(6473) :711–8.
- [Jardetzky et al., 1996] Jardetzky, T. S., Brown, J. H., et al. (1996). Crystallographic Analysis of Endogenous Peptides Associated with HLA-DR1 Suggests a Common, Polyproline II-Like Conformation for Bound Peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(2) :734–8.
- [Jardetzky et al., 1990] Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Busch, R., et al. (1990). Peptide binding to HLA-DR1 : A peptide with most residues substituted to alanine retains MHC binding. *Embo J*, 9(6) :1797–803.
- [Johansson et al., 2003] Johansson, S., Lie, B. A., Pociot, F., et al. (2003). HLA associations in type 1 diabetes : Dpb1 alleles may act as markers of other hla-complex susceptibility genes. *tissue Antigens*, 61 :344–351.
- [Johnson et al., 2006] Johnson, L., Heemskerk, B., Powell, D., et al. (2006). Gene transfer of tumor-reactive tcr confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *J.immuno*, 177 :6548–59.
- [Johnson and Howerth, 2004] Johnson, M. and Howerth, E. (2004). Survivin : A bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol*, 41 :599–607.
- [Jonuleit et al., 1997] Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., et al. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum free conditions. *Eur J Immunol*, 27(12) :3135–42.
- [Jonuleit et al., 2002] Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., et al. (2002). Infectious tolerance : human CD25(+) regulatory t cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med*, 196(2) :255–60.
- [Joza et al., 2001] Joza, N., Susin, S., Daugas, E., et al. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828) :549–54.

- [Junj-Kuang et al., 2002] Junj-Kuang, H., Damien, Y., O'SConnor, D., et al. (2002). Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol. Cell Biol.*, 22 :78–93.
- [Kaplan et al., 1998] Kaplan, D., Shankaran, V., Dighe, A., et al. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 :7556–61.
- [Kappcs and Strominger, 1988] Kappcs, D. and Strominger, J. L. (1988). Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 57 :991–1028.
- [Karlhofer et al., 1992] Karlhofer, F., Ribaud, R., and Yokoyama, W. (1992). MHC class I alloantigen specificity of ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature*, 358 :66–70.
- [Kawakami et al., 1998] Kawakami, Y. and Robbins, P., Wang, X., et al. (1998). Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles. *J Immunol*, 161(12) :6985–92.
- [Kawakami et al., 1994] Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C., et al. (1994). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(1) :3515–9.
- [Kawakami et al., 1995] Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., et al. (1995). Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol*, 154(8) :3961–3968.
- [Kawano et al., 1997] Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., et al. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*, 278(5343) :1626–9.
- [Kawano et al., 1998] Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., et al. (1998). Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(10) :5690–3.
- [Kawano et al., 1999] Kawano, T., Nakayama, T., Kamada, N., et al. (1999). Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells. *Cancer Res*, 59(20) :5102–5.
- [Keene and Forman, 1982] Keene, J. A. and Forman, J. (1982). Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 155(3) :768–82.
- [Kessler et al., 2001] Kessler, J., Beekman, N., Bres-Vloemans, S., et al. (2001). Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J Exp Med*, 193 :73–80.
- [Khoury et al., 1992] Khoury, S., Hancock, W., and Weiner, H. (1992). Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin e expression in the brain. *J Exp Med.*, 176(5) :1355–64.
- [Kim et al., 2002] Kim, C., Dessureault, S., Gabrilovich, i., et al. (2002). Immunotherapy for melanoma. *Cancer Control*, 9(1) :22–30.

- [Kischkel and Hellbardt, 1995] Kischkel, F. C. and Hellbardt, S. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (disc) with the receptor. *Embo J*, 14(22) :5579–88.
- [Klein et al., 1992] Klein, B. S., Sondel, P. M., and Jones, J. M. (1992). WI-1, a novel 120-kilodalton surface protein on *Blastomyces dermatitidis* yeast cells, is a target antigen of cell-mediated immunity in human blastomycosis. *Infect Immun.*, 60(10) :4291–300.
- [Klionsky and Emr, 2000] Klionsky, D. and Emr, S. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.*, 290(5497) :1717–21.
- [Knuth et al., 1989] Knuth, A., Wölfel, T., Klehmann, E., et al. (1989). Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma : specificity study and definition of three antigens by immunoselection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 :2804–2808.
- [Knutson et al., 2001] Knutson, K., Schiffman, K., and Disis, M. (2001). Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates of HER-2/neu CD8 T cell immunity in cancer patients. *J. Clin. Investig.*, 107 :477–484.
- [Kobayashi et al., 2000] Kobayashi, H., Wood, M., Song, Y., et al. (2000). Defining promiscuous MHC class II helper T-cell epitopes for the her2/neu tumor antigen. *Cancer Res.*, 60(18) :5228–36.
- [Koelle et al., 2000] Koelle, D. M., Reymond, S. N., Chen, H., et al. (2000). Tegument-specific, virus-reactive CD4 T cells localize to the cornea in herpes simplex virus interstitial keratitis in humans. *J Virol*, 74(23) :10930–8.
- [Krieger et al., 1991] Krieger, J. I., Karr, R. W., Grey, H. M., , et al. (1991). Single amino acid changes in DR and antigen define residues critical for peptide-MHC binding and T cell recognition. *J Immunol*, 146(7) :2331–40.
- [Kropshofer et al., 1996] Kropshofer, H., Vogt, A., Moldenhauer, G., et al. (1996). Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *Embo J*, 15(22) :6144–54.
- [Kuhn and Poenie, 2002] Kuhn, J. R. and Poenie, M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity*, 16(1) :111–21.
- [Kursar et al., 2002] Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., et al. (2002). Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J. Exp. Med.*, 196(12) :1585–92.
- [Langenkamp et al., 2000] Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., et al. (2000). Kinetics of dendritic cell activation : impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 1(4) :311–6.
- [Lantz and Bendelac, 1994] Lantz, O. and Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class II specific CD4+ and CD4- T cells in mice and humans. *J Exp Med*, 180 :1097–106.
- [Lanzavecchia and Sallusto, 2000] Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2000). Dynamics of T lymphocyte responses : intermediates, effectors, and memory cells. *Immunology*, 290(5489) :92–7.

- [Lapointe et al., 2001] Lapointe, R., Royal, R., Reeves, M., et al. (2001). Retrovirally transduced human dendritic cells can generate t cells recognizing multiple mch class i and class ii epitopes from the melanoma antigen glycoprotein 100. *J immunol*, 167 :4758.
- [Laux et al., 2003] Laux, G., Mansmann, U., Deufel, A., et al. (2003). A new epitope-based HLA-DPB matching approach for cadaver kidney retransplants. *transplantation*, 75(9) :1527–32.
- [Lazetic et al., 1996] Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J., et al. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKg2 subunits. *J Immunol.*, 157(11) :4741–5.
- [Le Borgne et al., 2006] Le Borgne, M., Etchart, N., Goubier, A., et al. (2006). Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via ccr6/ccl20 are responsible for cd8+ t cell crosspriming in vivo. *Immunity.*, 24(2) :191–201.
- [Lee et al., 2001] Lee, P., Wang, F., Kuniyoshi, J., et al. (2001). Effects of interleukin-12 on the immune response to a multi-peptide vaccine for resected metastatic melanoma. *J Clin Oncol.*, 19(18) :3836–47.
- [Lenschow et al., 1996] Lenschow, D., Walunas, T. L., and Bluestone, J. (1996). CD28/b7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14 :233–58.
- [Lethe et al., 1998] Lethe, B., Lucas, S., Michaux, L., et al. (1998). LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int J Cancer*, 76 :903–8.
- [Levings et al., 2001] Levings, M., Sangregorio, R., and Galbiati, F. (2001). IFN- α and il-10 induce the differentiation of human type 1 t regulatory cells. *J Immunol.*, 166(9) :5530–9.
- [Li et al., 1998a] Li, H., Zhu, H., Xu, C., and Yuan, J. (1998a). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4) :491–501.
- [Li et al., 1998b] Li, K., Adibzadeh, M., Halder, T., et al. (1998b). Tumor-specific mhc-class-ii-restricted responses after in vitro sensitization to synthetic peptides corresponding to gp100 and annexin ii eluted from melanoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 47 :32–44.
- [Lieberman, 2003] Lieberman, J. (2003). The abcs of granule-mediated cytotoxicity : new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*, 3(5) :361–70.
- [Liew, 2002] Liew, F. Y. (2002). Th1 and Th2 cells : a historical perspective. *Nat Rev Immunol*, 2(1) :55–60.
- [Littaua et al., 1992] Littaua, R., takeda, A., Cruz, J., et al. (1992). Vaccinia virus-specific human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol.*, 66(4) :2274–80.
- [Ljunggren et al., 1990] Ljunggren, H., Sturmhofel, K., Wolpert, E., et al. (1990). Transfection of beta 2-microglobulin restores IFN-mediated protection from natural killer cell lysis in yac-1 lymphoma variants. *J. Immunol.*, 145 :380–6.
- [Lonchay et al., 2004] Lonchay, C., van der Bruggen, P., Connerotte, T., et al. (2004). Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with aMAGE antigen. *PNAS*, 101(suppl.2) :14631–38.

- [Lotze et al., 2000] Lotze, M., Shurin, M., Esche, C., et al. (2000). Interleukin-2 developing additional cytokine gene therapy using fibroblasts or dendritic cells to enhance tumor immunity. *Cancer J Sci Am*, 6 :S61–S66.
- [Lundin et al., 2003] Lundin, K., Hofgaard, P., Omholt, H., et al. (2003). Therapeutic effect of idiotypespecific CD4+ T cells against B-cell lymphoma in the absence of antiidiotypic antibodies. *Blood*, 102(2) :605–12.
- [Luo et al., 1998] Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., et al. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4) :481–90.
- [Macdonald, 1995] Macdonald, H. R. (1995). NK1.1 T cell receptor- α /b1 cells : new clues to their origin, specificity, and function. *J. Exp. Med.*, 182 :633–638.
- [Mackensen et al., 2000] Mackensen, A., Herbst, B., Chen, J. L., et al. (2000). Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulseddendritic cells generated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer*, 93(86) :385–392.
- [Mackensen et al., 1994] Mackensen, A. and Carcelain, G., Viel, S., et al. (1994). Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J Clin Invest.*, 93(4) :1397–402.
- [Mackey et al., 1998] Mackey, M., Gunn, J., Maliszewsky, C., et al. (1998). Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol*, 161(5) :2094–8.
- [Madden, 1995] Madden, D. R. (1995). The three-Dimensional Structure of Peptide-MHC Complexes. *Annu Rev Immunol*, 13 :587–622. Using Smart Source Parsing.
- [Mailliard et al., 2004] Mailliard, R., Wankowicz-Kalinska, A., Cai, Q., et al. (2004). α -type-1 polarizeddendritic cells : a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res.*, 64(17) :5934–7.
- [Malarkannan et al., 1998] Malarkannan, S., Shih, P., Eden, P., et al. (1998). The molecular and functional characterization of a dominant minor h antigen, h60. *J Immunol.*, 161(7) :3501–9.
- [Malcherek et al., 1993] Malcherek, G., Falk, K., Rotzschke, O., et al. (1993). Natural peptide ligand motifs of two HLA molecules associated with myasthenia gravis. *Int Immunol*, 5(10) :1229–37.
- [Mandelboim and Berke, 1994] Mandelboim, O. and Berke, G. (1994). CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature*, 369(6475) :67–71.
- [Mandelboim et al., 1995] Mandelboim, O., Vadai, E., Fridkin, M., et al. (1995). Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides. *Nat Med.*, 1(1) :1179–83.
- [Mandic et al., 2005] Mandic, M., Castelli, F., Janjic, B., et al. (2005). One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4+ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J. Immunol.*, 174(3) :1633–1640.

- [Mandrizzato et al., 1997] Mandrizzato, S., Brasseur, F., Andry, G., et al. (1997). A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med*, 196 :785–793.
- [Manici et al., 1999] Manici, S., Sturniolo, T., Imro, M., et al. (1999). Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen dr11. *J Exp Med*, 189(5) :871–6.
- [Marchand et al., 2003] Marchand, M., Punt, C., Aamdal, S., et al. (2003). Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2 : a clinical report. *Eur J Cancer*, 39(1) :70–7.
- [Marchand et al., 1999] Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., et al. (1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*, 80(2) :219–30.
- [Maric et al., 1994] Maric, M., Taylor, M., and Blum, J. (1994). Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(6) :2171–5.
- [Marshall et al., 1994] Marshall, K. W., Liu, A. F., Canales, J., et al. (1994). Role of the polymorphic residues in HLA-DR molecules in allele-specific binding of peptide ligands. *J Immunol*, 152(10) :4946–57.
- [Marshall et al., 1995] Marshall, K. W., Wilson, K. J., Liang, J., et al. (1995). Prediction of peptide affinity to HLA DR molecules. *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids*, 1(3) :157–62. Using Smart Source Parsing.
- [Marzo et al., 2000] Marzo, A., Kinnear, B., Lake, R., et al. (2000). Tumor-specific CD4+ T cells have a major “post-licensing” role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol*, 165(11) :6047–55.
- [Mattes et al., 2003] Mattes, J., Hulett, M., Xie, W., et al. (2003). Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells : an eotaxin and stat6-dependent process. *J Exp Med*, 197(3) :387–93.
- [Mawas et al., 1980] Mawas, C., Charmot, D., and Mercier, P. (1980). Split of HLA-D into two regions alpha and beta by a recombination between HLA-D and GLO. *Tissue Antigens*, 15 :458–66.
- [Mcdevitt, 1995] Mcdevitt, H. (1995). Evolution of MHC class II allelic diversity. *Immunol Rev*, 143 :113–22.
- [Mcglave et al., 1990] Mcglave, P., Beatty, P., Ash, R., et al. (1990). Therapy for chronic myelogenous leukemia with unrelated donor bone marrow transplantation : Results in 102 cases. *Blood*, 75 :1728.
- [Middleton et al., 1992] Middleton, D., Mytilineos, Y., Savage, D., et al. (1992). Matching for HLA-DPB1 alleles in zero mismatched HLA-A, -B, and -DR renal transplants. *transplant Proc*, 24(6) :2439–40.

- [Moreau and Cesbron, 1994] Moreau, P. and Cesbron, A. (1994). HLA-DP and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow transplant*, 13(6) :675–81.
- [Morel et al., 2000] Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., et al. (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity*, 12 :107–12.
- [Moreland et al., 1996] Moreland, L. W., Heck, L., Koopman, W. J., et al. (1996). V beta 17 T cell receptor peptide vaccination in rheumatoid arthritis : results of phase I dose escalation study. *J Rheumatol.*, 23(8) :1353–62.
- [Moretta et al., 1993] Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., et al. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (nk) cells. anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J.Exp.Med.*, 178(2) :597–604.
- [Morton et al., 1984] Morton, C. C., Kirsch, I. R., et al. (1984). Orientation of Loci within the Human Major Histocompatibility Complex by Chromosomal in Situ Hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(9) :2816–20.
- [Mosmann et al., 1997] Mosmann, T. R., Li, L., and Sad, S. (1997). Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Seminars in Immunology*, 9(2) :87–92.
- [Moss et al., 1999] Moss, D., Khanna, R., and Sherritt, M. (1999). Developing immunotherapeutic strategies for the control of epstein-barr virus-associated malignancies. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, 21(suppl 1) :S80–3.
- [Motyka et al., 2000] Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M., et al. (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor ii receptor is a death receptor for granzyme b during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*, 103(3) :491–500.
- [Muderspach et al., 2000] Muderspach, L., Wilczynski, S., Roman, L., et al. (2000). A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. *Clin Cancer Res*, 6(9) :3406–16.
- [Murakami et al., 2002] Murakami, M., Sakamoto, A., Bender, J., et al. (2002). CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 :8832–37.
- [Murphy et al., 1999] Murphy, G., tjoan, B., Simmons, S. J., et al. (1999). Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides : a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease. *the Prostate*, 38(1) :73–8.
- [Muzio et al., 1996] Muzio, M., Chinnaiyan, A., Kischkel, F., et al. (1996). FLICE, a novel FADD homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 85(6) :817–27.
- [Nair et al., 2000] Nair, S., Heiser, A., Boczkowski, D., et al. (2000). Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase rna transfected dendritic cells. *Nat Med*, 6 :1011–7.

- [Neumann et al., 1998] Neumann, E., Engelsberg, A., and Decker, J. (1998). Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens rage-1, prame, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma : candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res.*, 58(18) :4090–5.
- [Newton-Nash and Eckels, 1993] Newton-Nash, D. K. and Eckels, D. D. (1993). Differential effect of polymorphism at HLA-DR1 beta-chain positions 85 and 86 on binding and recognition of dr1-restricted antigenic peptides. *J Immunol*, 150(5) :1813–21.
- [Noble et al., 2002] Noble, J. A., Valdes, A. M., Bugawan, T. L., et al. (2002). The HLA class I a locus affects susceptibility to type 1 diabetes. *Hum Immunol*, 63 :657–664.
- [Noble et al., 1996] Noble, J. A., Valdes, A. M., Cook, M., et al. (1996). The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus : molecular analysis of 180 caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet*, 59 :1134–1148.
- [Noble et al., 2000] Noble, J. A., Valdes, A. M., Thomson, G., et al. (2000). The hla class II locus DPB1 can influence susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes*, 49 :121–125.
- [Norcross, 1984] Norcross, M. A. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)*, 135D(2) :46–52.
- [Ochsenbein et al., 2001] Ochsenbein, A. F., Sierro, S., Odermatt, B., et al. (2001). Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature*, 411 :1058–1064.
- [Odorizzi et al., 1994] Odorizzi, C., trowbridge, I., Xue, L., et al. (1994). Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J Cell Biol*, 126(2) :317–30.
- [Okada et al., 1985] Okada, K., Prentice, H. L., et al. (1985). SB subregion of the human major histocompatibility complex : gene organization, allelic polymorphism and expression in transformed cells. *Embo Jt*, 4(3) :739–48.
- [Okamoto et al., 1998] Okamoto, Y., Kurane, I., Leporati, A. M., et al. (1998). Definition of the region on NS3 which contains multiple epitopes recognized by dengue virus serotype-cross-reactive and flavivirus-cross-reactive,HLA-DPw2-restricted CD4+ T cell clones. *J Gen Virol*, 79(4) :97–704.
- [Onizuka et al., 1999] Onizuka, S., tawara, I., Shimizu, J., et al. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor α) monoclonal antibody. *Cancer Res.*, 59 :3128–33.
- [Orange et al., 2004] Orange, D. E., Jegathesan, M., Blachere1, N., et al. (2004). Effective antigen crosspresentation by prostate cancer patients’ dendritic cells : implications for prostate cancer immunotherapy. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 7 :63–72.
- [Ossendorp et al., 2000] Ossendorp, F., toes, R., Offringa, R., et al. (2000). Importance of CD4(+) T helper cell responses in tumor immunity. *Immunol Lett*, 74(1) :75–9.
- [Ostrand-Rosenberg et al., 1990] Ostrand-Rosenberg, S., thakur, A., and Clements, V. (1990). Rejection of mouse sarcoma cells after transfection of MHC class II genes. *J. Immunol.*, 144 :4068–71.

- [O'Sullivan et al., 1991] O'Sullivan, D., Sidney, J., Del Guercio, M. F., et al. (1991). Truncation analysis of several dr binding epitopes. *J Immunol*, 146(4) :1240–6.
- [Otto et al., 2005] Otto, K., Andersen, M., Eggert, A., et al. (2005). Lack of toxicity of therapy-induced T-cell responses against the universal tumour antigen survivin. *Vaccine*, 23 :987–94.
- [Panigada et al., 2002] Panigada, M., Sturniolo, T., Besozzi, G., et al. (2002). Identification of a promiscuous T-cell epitope in mycobacterium tuberculosis mce proteins. *Infection and Immunity*, 70(1) :79–85.
- [Parker et al., 1994] Parker, K. C., Bednarek, M. A., , and Coligan, J. E. (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide sidechains. *J. Immunol.*, 152 :163–175.
- [Parkhurst et al., 1996] Parkhurst, M., Salgaller, M., Southwood, S., et al. (1996). Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J. Immunol.*, 157 :2539–2548.
- [Parmiani et al., 2002] Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P., et al. (2002). Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines : What have we achieved? where are we going? *Journal of the National Cancer Institute*, 94(11) :805–18.
- [Parmiani et al., 2003] Parmiani, G., Pilla, L., Castelli, C., et al. (2003). Vaccination of patients with solid tumours. *Annals of Oncology*, 14 :817–24.
- [Pasare and Medzhitov, 2004] Pasare, C. and Medzhitov, R. (2004). Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*, 21 :733–741.
- [Pauletti et al., 1996] Pauletti, G., Godolphin, W., Press, M., et al. (1996). Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*, 13 :63–72.
- [Pellat-Deceunynck et al., 2000] Pellat-Deceunynck, C., Mellerin, M. P., Labarriere, N., et al. (2000). The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells. *Eur J Immunol.*, 30(3) :803–9.
- [Pena and Krensky, 1997] Pena, S. V. and Krensky, A. M. (1997). Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol*, 9(2) :117–25.
- [Perreault et al., 1998] Perreault, C., Roy, D., and Fortin, C. (1998). Immunodominant minor histocompatibility antigens : the major ones. *Immunol today.*, 19(2) :69–74.
- [Petersdorf et al., 2001] Petersdorf, E., Gooley, T., Malkki, M., et al. (2001). The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.*, 112(4) :988–94.
- [Petersdorf et al., 1993] Petersdorf, E., Smith, A., Mickelson, E., et al. (1993). The role of HLA-DPb1 disparity in the development of acute graft-versus-host disease following unrelated donor marrow transplantation. *Blood*, 81(7) :1923–32.

- [Pfreundschuh, 2000] Pfreundschuh, M. (2000). Exploitation of the b cell repertoire for the identification of human tumor antigens. *Cancer Chemother Pharmacol*, 46 suppl. :S3–7.
- [Pieters et al., 1993] Pieters, J., Bakke, O., and Dobberstein, B. (1993). The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J Cell Sci*, 106(Pt 3) :831–46.
- [Pinkoski et al., 1998] Pinkoski, M., Hobman, M., Heibein, J., et al. (1998). Entry and trafficking of granzyme B in target T cells during granzyme b-perforin-mediated apoptosis. *Blood*, 92(3) :1044–54.
- [Pittet et al., 2001] Pittet, M., Zippelius, A., Speiser, D., et al. (2001). Ex vivo IFN-gamma secretion by circulating CD8 T lymphocytes : implications of a novel approach for T cell monitoring in infectious and malignant diseases. *J Immunol*, 166 :7634–7640.
- [Powrie and Maloy, 2003] Powrie, F. and Maloy, K. (2003). Immunology. regulating the regulators. *Science*, 299 :1030–1031.
- [Press et al., 1997] Press, M., Bernstein, L., Thomas, P., et al. (1997). HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization : poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol*, 15 :2894–904.
- [Preuss et al., 2002] Preuss, K., Zwick, C., Bormann, C., et al. (2002). Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev*, 188 :43–50.
- [Pulaski et al., 2000] Pulaski, B., Clements, V., Pipeling, M., et al. (2000). Immunotherapy with vaccines combining MHC class II/CD80+ tumor cells with interleukin-12 reduces established metastatic disease and stimulates immune effectors and monokine induced by interferon- γ . *Cancer Immunol. Immunother.*, 49 :34–45.
- [Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 1998] Pulaski, B. A. and Ostrand-Rosenberg, S. (1998). Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res.*, 58 :1486–93.
- [Qin and Blankenstein, 2000] Qin, Z. and Blankenstein, T. (2000). CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*, 12(6) :677–86.
- [Raddrizzani et al., 1997] Raddrizzani, L., Sturniolo, T., Guenot, J., et al. (1997). Different modes of peptide interaction enable hla-DQ and HLA-DR molecules to bind diverse peptide repertoires. *J Immunol*, 159(2) :703–11.
- [Rafiq et al., 2002] Rafiq, K., Bergtold, A., and Clynes, R. (2002). Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest*, 110 :71–79.
- [Rammensee et al., 1999] Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N., et al. (1999). SYFPEITHI : database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50(3-4) :213–9.
- [Rammensee et al., 1993] Rammensee, H. G., Falk, K., and Rotzschke, O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol*, 11 :213–44. Using Smart Source Parsing.

- [Rammensee et al., 1995] Rammensee, H. G., Friede, T., and Stevanović, S. (1995). MHC ligands and peptide motifs : First listing. *Immunogenetics*, 41(4) :178–228. Using Smart Source Parsing.
- [Ramshaw and Ramsay, 2000] Ramshaw, I. and Ramsay, A. (2000). The prime-boost strategy : Exciting prospects for improved vaccination. *Immunol today*, 21 :163–165.
- [Reche and Reinherz, 2003] Reche, P. and Reinherz, E. (2003). Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules : functional and structural correlates of amino acid polymorphisms. *J Mol Biol.*, 331(3) :623–41.
- [Reilly et al., 2001] Reilly, R., Machiels, J., Emens, L., et al. (2001). The collaboration of both humoral and cellular HER-2/neu-targeted immune responses is required for the complete eradication of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res*, 61(3) :880–3.
- [Reker et al., 2004] Reker, S., Meier, A., Holten-Andersen, L., et al. (2004). Identification of novel survivin-derived CTL epitopes. *ancer Biol ther.*, 3(2) :173–9.
- [Ressing et al., 1995] Rensing, M., Sette, A., Brandt, R., et al. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 e6 and e7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol*, 154(11) :5934–43.
- [Ribas et al., 2002] Ribas, A., Butterfield, L., Glaspy, J., et al. (2002). Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Curr Gene ther*, 2 :57–78.
- [Ribas et al., 2003] Ribas, A., Butterfield, L., Glaspy, J., et al. (2003). Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J Clin Oncol.*, 21(12) :2415–2432.
- [Richeldi et al., 1997] Richeldi, L., Kreiss, K., Mroz, M., et al. (1997). Interaction of genetic and exposure factors in the prevalence of berylliosis. *Am J Ind Med*, 32 :337–40.
- [Richeldi et al., 1993] Richeldi, L., Sorrentino, R., and Saltini, C. (1993). HLA-DPB1 glutamate 69 : a genetic marker of beryllium disease. *science*, 262 :242–4.
- [Robbins et al., 2002] Robbins, P., El-Gamil, M., Li, Y., et al. (2002). Multiple hla class ii-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J Immunol*, 169 :6036–6047.
- [Robbins and Kawakami, 1996] Robbins, P. and Kawakami, Y. (1996). Human tumor antigens recognized by T cells. *Curr Opin Immunol*, 8 :628–36.
- [Rocha and Tanchot, 2004] Rocha, B. and Tanchot, C. (2004). Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory : the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr Opin Immunol*, 16(3) :259–63.
- [Roche and Cresswell, 1991] Roche, P. and Cresswell, P. (1991). Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(8) :3150–4.
- [Roche et al., 1991] Roche, P., Marks, M., and P., C. (1991). Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature*, 354(6352) :392–4.

- [Roche et al., 1992] Roche, P., teletski, C., Karp, D., et al. (1992). Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR. *Embo J*, 11(8) :2841–7.
- [Rohayem et al., 2000] Rohayem, J., Diestelkoetter, P., Weigle, B., et al. (2000). Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.*, 60(7) :1815–7.
- [Romagnani, 1997] Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol today*, 18(6) :263–6.
- [Romieu et al., 1998] Romieu, R., Baratin, M., Kayibanda, M., et al. (1998). IFN-gamma-secreting th cells regulate both the frequency and avidity of epitope-specific CD8+ T lymphocytes induced by peptide immunization : an ex vivo analysis. *Int Immunol.*, 10(9) :273–9.
- [Rosenberg et al., 1985a] Rosenberg, S.A. and Mule, J., Spiess, P., et al. (1985a). Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of highdose recombinant interleukin 2. *J Exp Med*, 161 :1169–88.
- [Rosenberg, 2001] Rosenberg, S. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411 :380–4.
- [Rosenberg et al., 1999] Rosenberg, S., Yang, J., Schwartzentruber, D., et al. (1999). Impact of cytokine administration on the generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. *J Immunol.*, 163(3) :1690–5.
- [Rosenberg et al., 1985b] Rosenberg, S. A., Lotze, M., Muul, L., et al. (1985b). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med*, 313 :1485–92.
- [Rosenberg et al., 1998] Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., et al. (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic tumorassociated peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat. Med.*, 4 :321–327.
- [Rossman et al., 2002] Rossman, M. D., Stubbs, J., Lee, C. W., et al. (2002). Human leukocyte antigen class II amino acid epitopes : susceptibility and progression markers for beryllium hypersensitivity. *Am J Respir Crit Care Med*, 165 :788–94.
- [Rubinfeld et al., 1997] Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., et al. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science*, 275(5307) :1790–2.
- [Rudensky et al., 1991] Rudensky, A. Y., Preston-Hurlburt, P., et al. (1991). Sequence Analysis of Peptides Bound to MHC Class II Molecules. *Nature*, 353(6345) :622–7.
- [Russo et al., 1996] Russo, V., Dalerba, P., Ricci, A., et al. (1996). MAGE BAGE and GAGE genes expression in fresh epithelial ovarian carcinomas. *Int J Cancer.*, 67(3) :457–60.
- [SaaveDRa et al., 1991] SaaveDRa, R., de Meuter, F., Decourt, J. L., et al. (1991). Human T cell clone identifies a potentially protective 54-kDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*. *J Immunol.*, 147(6) :1975–82.
- [Sah et al., 2006] Sah, N., Khan, Z., Khan, G., et al. (2006). Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Letters*, 244(2) :164–71.

- [Sakaguchi et al., 2001] Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., et al. (2001). Immunologic tolerance maintained by cd25+ cd4+ regulatory t cells : their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.*, 182 :18–32.
- [Sallusto et al., 1999] Sallusto, F. and Lenig, D., Forster, R., et al. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754) :708–12.
- [Savage et al., 2002] Savage, N., Kimzey, S., Bromley, S., et al. (2002). Polar redistribution of the sialoglycoprotein CD43 : implications for T cell function. *J Immunol*, 168(8) :3740–6.
- [Scaffidi et al., 1998] Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., et al. (1998). Two CD95 APO-1/Fas signaling pathways. *Embo J*, 17(6) :1675–887.
- [Schadendorf et al., 2006] Schadendorf, D., Hauschild, A., and Ugurel, S. (2006). Dose-intensified bi-weekly temozolomide in patients with asymptomatic brain metastases from malignant melanoma : a phase ii decog/ado study. *Ann Oncol.*, 17 :1592–7.
- [Schadendorf and Nestle, 2001] Schadendorf, D. and Nestle, F. (2001). Autologous dendritic cells for treatment of advanced cancer – an update. *Recent Res Cancer Res*, 158 :236–248.
- [Scheibenbogen et al., 2000] Scheibenbogen, C., Schmittel, A., Keilholz, U., et al. (2000). Phase II trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte- macrophage colonystimulating factor in patients with metastatic melanoma. *J Immunother*, 23(2) :275–81.
- [Schmitz et al., 2005] Schmitz, M., Kiessling, A., Weigle, B., et al. (2005). T cell-based strategies for immunotherapy of prostate cancer. *Cancer therapy*, 3 :565–78.
- [Schroers et al., 2003] Schroers, R., Shen, L., Rollins, L., et al. (2003). Identification of MHC class II-restricted T-cell epitopes in prostate-specific membrane antigen. *Clinical Cancer Research*, 9 :3260–3271.
- [Schuler-thurner et al., 2002] Schuler-thurner, B., Schultz, E. S., Berger, T. G., et al. (2002). Rapid Induction of tumor-Specific type 1 T Helper Cells in Metastatic Melanoma Patients by Vaccination with Mature, Cryopreserved, Peptide-Loaded Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Exp Med*, 195(10) :1279–88.
- [Schultz et al., 2000] Schultz, E. S., Lethe, B., Cambiaso, C. L., et al. (2000). A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4+ cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res*, 60(22) :6272–5.
- [Schwartz, 1992] Schwartz, R. H. (1992). Costimulation of T lymphocytes : the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*, 71(7) :1065–8.
- [Schwartzentruber et al., 1994] Schwartzentruber, D., Hom, S., Dadmar, R., et al. (1994). In vitro predictors of therapeutic response in melanoma patients receiving tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2. *J. Clin. Oncol.*, 12 :1475–88.
- [Sercarz et al., 1993] Sercarz, E. E., Lehmann, P. V., Ametani, A., et al. (1993). Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol*, 11 :729–66.

- [Sette et al., 1993] Sette, A., Sidney, J., Gaeta, F. C., et al. (1993). MHC class II molecules bind indiscriminately self and non-self peptide homologs : Effect on the immunogenicity of non-self peptides. *Int Immunol*, 5(6) :631–8.
- [Shahinian et al., 1993] Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K., et al. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *J Immunol*, 261(5121) :609–12.
- [Shankaran et al., 2001] Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A., et al. (2001). IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832) :1107–11.
- [Shaw et al., 2003] Shaw, B., Potter, M., Mayor, N., et al. (2003). The degree of matching at HLA-DPB1 predicts for acute graft-versus-host disease and disease relapse following haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow transplant.*, 31(11) :1001–8.
- [Shaw and Johnson, 1980] Shaw, S. and Johnson, A.H. and Shearer, G. (1980). Evidence for a new segregant series of B-cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogeneic proliferative and cytotoxic responses. *J Exp Med*, 152 :565–580.
- [Shimizu et al., 1999] Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells : a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.*, 163 :5211–18.
- [Sidney et al., 1992] Sidney, J., Oseroff, C., Southwood, S., et al. (1992). DRB1*0301 molecules recognize a structural motif distinct from the one recognized by most DR beta 1 alleles. *J Immunol*, 149(8) :2634–40.
- [Siegal et al., 1999] Siegal, F., Kadowaki, N., Shodell, M., et al. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 284(5421) :1835–7.
- [Siegel et al., 2004] Siegel, S., Steinmann, J., Schmitz, N., et al. (2004). Identification of a survivin-derived peptide that induces HLA-A*0201-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Leukemia.*, 18(12) :2046–7.
- [Skipper et al., 1996] Skipper, J., HenDRickson, R., Gulden, P., et al. (1996). An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med*, 183(2) :527–34.
- [Small et al., 2000] Small, E., Fratesi, P., Reese, D., et al. (2000). Immunotherapy of hormonerefractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol*, 18 :3894–3903.
- [Smyth et al., 2001] Smyth, M., Godfrey, D., and trapani, J. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2(4) :293–9.
- [Smyth et al., 2000] Smyth, M., thia, K., Street, S., et al. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (nk) and NKT cells. *J Exp Med*, 191(4) :661–8.
- [Song et al., 2003] Song, Z., Yao, X., and Wu, M. (2003). Direct interaction between smac/DIABLO is essential for anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 278 :23130–23140.

- [Sotomayor et al., 2001] Sotomayor, E. M., Borrello, I., Rattis, F., et al. (2001). Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during b-cell lymphoma progression. *Blood*, 98 :1070–7.
- [Southwood et al., 1998] Southwood, S., Sidney, J., Kondo, A., et al. (1998). Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J Immunol*, 160(7) :3363–73.
- [Stassar et al., 2001] Stassar, M., RadDRizzani, L., Hammer, J., et al. (2001). T-helper cell-response to MHC class II-binding peptides of the renal cell carcinoma-associated antigen RAGE-1. *Immunobiology*, 203(5) :743–55.
- [Steiner et al., 1997] Steiner, L., McCurdy, D., Cavalli, A., et al. (1997). Two new DPB1 alleles identified in a study of the genetics of susceptibility to pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis. *tissue Antigens*, 49(6468) :262–6.
- [Steitz et al., 2001] Steitz, J., Bruck, J., Lenz, J., et al. (2001). Depletion of CD25+CD4+ T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon α -induced, CD8+ T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res.*, 61 :8643–46.
- [Stern et al., 1994] Stern, L. J., Brown, J. H., et al. (1994). Crystal Structure of the Human Class II MHC Protein HLA-DR1 Complexed with an Influenza Virus Peptide. *Nature*, 368(6468) :215–21.
- [Steven et al., 1997] Steven, N., Annels, N., Kumar, A., et al. (1997). Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the epstein-barr virus-induced cyto-toxic t cell response. *J. Exp. Med.*, 185 :1605–1617.
- [Sturniolo et al., 1999] Sturniolo, T., Bono, E., Ding, J., et al. (1999). Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices [see comments]. *Nat Biotechnol*, 17(6) :555–61.
- [Sugden and Warren, 1989] Sugden, B. and Warren, N. (1989). A promoter of epstein-barr virus that can function during latent infection can be transactivated by ebna-1, a viral protein required for viral dna replication during latent infection. *J. Virol.*, 63 :2644–49.
- [Sugie et al., 1996] Sugie, T., Kubota, H., Sato, M., et al. (1996). NK11 CD42 CD82 ab T cells in the peritoneal cavity : specific T cell receptor-mediated cytotoxicity and selective IFN-g production against b cell leukemia and myeloma cells. *J. Immunol.*, 157 :3925–3935.
- [Sullivan et al., 1989] Sullivan, K., Witherspoon, R., Storb, R., et al. (1989). Long-term results of allogeneic bone marrow transplantation. *transplant Proc*, 21 :2926.
- [Sutmuller et al., 2001] Sutmuller, R., van Duivenvoorde, L., van Elsas, A., et al. (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25+ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.*, 194 :823–32.
- [Takahashi et al., 1996] Takahashi, M., Chiba, S., Nieda, M., et al. (1996). LPS induces NK1.1+ α β T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from kupffer cells. *J Immunol*, 156(7) :2436–42.

- [Takahashi et al., 2002] Takahashi, M., Ogasawara, K., Takeda, K., et al. (2002). Analysis of human α 24+cd8+ nk t cells activated by α -galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 168 :3140–44.
- [Terabe et al., 2005] Terabe, M., Swann, J., Ambrosino, E., et al. (2005). A nonclassical non- α 14 β 18 cd1d-restricted (type ii) nkt cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J Exp Med.*, 202 :1627–33.
- [Termijtelen et al., 1984] Termijtelen, A., Naipal-van den Berge, S., Suwandi-thung, L., et al. (1984). The influence of matching for SB on MLC typing is significant but marginal. *Scan J Immunol*, 19 :265–8.
- [Teyton et al., 1990] Teyton, L., O’Sullivan, D., Dickson, P., et al. (1990). Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature*, 348(6296) :39–44.
- [Theobald et al., 1995] Theobald, M., Biggs, J., Dittmer, D., et al. (1995). Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 :11993–11997.
- [Thomas and Hersey, 1998] Thomas, W. D. and Hersey, P. (1998). tnfr-related apoptosis-inducing ligand (trail) induces apoptosis in fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol*, 161(5) :2195–200.
- [Thurner et al., 1999] Thurner, B., Haendler, I., Roder, C., et al. (1999). Vaccination with MAGE-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanomas. *J Exp Med*, 190 :1669–1678.
- [Toes et al., 1999] Toes, R., Ossendorp, F., Offringa, R., et al. (1999). CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med*, 189(5) :753–6.
- [Topalian et al., 1989] Topalian, S., Solomon, D., and Rosenberg, S. (1989). Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Exp Med*, 142(10) :3714–25.
- [Touloukian et al., 2000] Touloukian, C., Leitner, W., S.L., T., et al. (2000). Identification of a mhc class ii restricted human gp100 epitope using dr4-ie transgenic mice. *J immunol*, 164 :3535–48.
- [Trapani et al., 2000] Trapani, J., Davis, J., Sutton, V., et al. (2000). Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol*, 12(3) :323–9.
- [Trapani and Smyth, 2002] Trapani, J. A. and Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2(10) :735–47.
- [Traversari et al., 1992] Traversari, C., van der Bruggen, P., and Luescher, I. (1992). A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen mz2-e. *J Exp Med.*, 176(5) :1453–7.
- [Trinchieri, 2003] Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 3(2) :133–46.

- [Trinchieri and Scott, 1999] Trinchieri, G. and Scott, P. (1999). Interleukin-12 : basic principles and clinical applications. *Curr top Microbiol Immunol*, 238 :57–78.
- [Trowsdale et al., 1991] Trowsdale, J., Ragoussis, J., and Campbell, R. D. (1991). Map of the Human MHC. *Immunol today*, 12(12) :443–6.
- [Tsang et al., 1995] Tsang, K., Zaremba, S., Nieroda, C., et al. (1995). Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-cea vaccine. *J Natl Cancer Inst.*, 87(13) :982–90.
- [Tsuruma et al., 2004] Tsuruma, T., Hata, F., Torigoe, T., et al. (2004). Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J transl Med.*, 2(1) :19–30.
- [Turley et al., 2000] Turley, S., Inaba, K., Garrett, W., et al. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, 288(5465) :522–7.
- [Uyttenhove et al., 2003] Uyttenhove, C., Pilotte, L., theate, I., et al. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, 9 :1269–74.
- [Valmori et al., 2000] Valmori, D., Dutoit, V., and Lienard, D. (2000). Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res.*, 60(16) :4499–506.
- [Valmori et al., 1998] Valmori, D., Fonteneau, J., Lizana, C., et al. (1998). Enhanced generation of specific tumor-reactive ctl in vitro by selected melan-a/mart-1 immunodominant peptide analogues. *J. immunol*, 160 :1750–1758.
- [van de Corput et al., 1997] van de Corput, L., Kluin-Nelemans, H., Kester, M., et al. (1997). Hairy cell leukemia-specific recognition by multiple autologous HLA-DQ or DP-restricted T-cell clones. *Blood*, 93 :251–259.
- [Van den Eynde et al., 1989] Van den Eynde, B., Hainaut, P., Herin, M., et al. (1989). Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL. *Int .J. Cancer*, 44(4) :634–40.
- [van der Bruggen et al., 1994] van der Bruggen, P., Bastin, J., Gajewski, T., et al. (1994). A peptide encoded by human geneMAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressingMAGE-3. *Eur J Immunol.*, 24(12) :3038–43.
- [van der Bruggen et al., 1991] van der Bruggen, P., traversari, C., Chomez, P., et al. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254 :1643.
- [van Driel et al., 1999] van Driel, W., Rensing, M., Kenter, G., et al. (1999). Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma : Clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur J Cancer*, 35(6) :946–52.
- [van Elsas et al., 1996] van Elsas, A., van der Burg, S., van der Minne, C., et al. (1996). Peptide-pulseddendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against

- stably HLA-A*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen. *Eur J Immunol.*, 26(8) :1683–9.
- [van Neerven et al., 1994] van Neerven, R. J., van de Pol, M. M., van Milligen, F. J., et al. (1994). Characterization of Cat Dander-Specific T Lymphocytes from Atopic Patients. *J Immunol.*, 152(8) :4203–10.
- [Varney et al., 1999] Varney, M., Lester, S., McCluskey, J., et al. (1999). Matching for HLA DPA1 and DPB1 alleles in unrelated bone marrow transplantation. *Hum Immunol.*, 60(6) :532–8.
- [Verreck et al., 1994] Verreck, F. A., van de Poel, A., termijtelen, A., et al. (1994). Identification of an HLA-DQ2 peptide binding motif and HLA-DPw3-bound self-peptide by pool sequencing. *Eur J Immunol.*, 24(2) :375–9.
- [Villunger and Strasser, 1999] Villunger, A. and Strasser, A. (1999). The great escape : is immune evasion required for tumor progression? *Nat Med.*, 5 :874–5.
- [Visseren et al., 1997] Visseren, M., van der Burg, S., van der Voort, E., et al. (1997). Identification of HLA-A*0201-restricted CTL epitopes encoded by the tumor-specific MAGE-2 gene product. *Int J Cancer.*, 73(1) :125–30.
- [Viville et al., 1993] Viville, S., Neefjes, J., Lotteau, V., et al. (1993). Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell*, 72(4) :635–48.
- [Vogt et al., 1994] Vogt, A. B., Kropshofer, H., Kalbacher, H., et al. (1994). Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol.*, 153(4) :1665–73.
- [Vonderheide et al., 1999] Vonderheide, R., Hahn, W., Schultze, J., et al. (1999). The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol today*, 10 :673–9.
- [Voo et al., 2002] Voo, K., Fu, T., Heslop, H., et al. (2002). Identification of HLA-DP3-restricted peptides from EBNA1 recognized by CD4(+) T cells. *Cancer Res.*, 62(24) :7195–9.
- [Wang et al., 1999a] Wang, F., Bade, E., Kuniyoshi, C., et al. (1999a). Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete freund’s adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clinical Cancer Research*, 5 :2756–2765.
- [Wang et al., 2004] Wang, H., Lee, D., Peng, G., et al. (2004). Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands : implications for immunotherapy. *Immunity*, 20 :107–18.
- [Wang et al., 1999b] Wang, R., Wang, X., and Rosenberg, S. (1999b). Identification of a novel major histocompatibility complex class II-restricted tumor antigen resulting from a chromosomal rearrangement recognized by CD4 T cells. *the Journal of Experimental Medicine*, 189(10) :1659–1667.
- [Wang, 2001] Wang, R. F. (2001). The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *trends Immunol.*, 22(5) :269–76.
- [Wang et al., 1999c] Wang, R. F., Wang, X., Atwood, A. L., et al. (1999c). Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens : mutated human CDC27 as a tumor antigen. *Science*, 284 :1351–1354.

- [Wang et al., 2003] Wang, S., Boonman, Z., Li, H., et al. (2003). Role of trail and IFN-gamma in CD4+ T cell-dependent tumor rejection in the anterior chamber of the eye. *J Immunol*, 171(6) :2789–96.
- [Wang et al., 2000] Wang, Z., Choice, E., Kaspar, A., et al. (2000). Bactericidal and tumoricidal activities of synthetic peptides derived from granulysin. *J Immunol*, 165(3) :1486–90.
- [Wang et al., 2001] Wang, Z., Farris, G. M., Newman, L. S., et al. (2001). Beryllium sensitivity is linked to HLA-DP genotype. *toxicology*, 165 :27–38.
- [Wang et al., 1999d] Wang, Z., White, P. S., Petrovic, M., et al. (1999d). Differential susceptibilities to chronic beryllium disease contributed by different glu69 HLA-DPB1 and -DPA1 alleles. *J Immunol.*, 163 :1647–53.
- [Waterhouse et al., 1996] Waterhouse, P., Marengere, L., Mittrucker, H., et al. (1996). CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev*, 153 :183–207.
- [Wells et al., 1997] Wells, A., Gudmundsdottir, H., and Turka, L. (1997). Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest*, 100(12) :3173–83.
- [Whiteside and Herberman, 1995] Whiteside, T. L. and Herberman, R. B. (1995). The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 7 :704–710.
- [Whitmire and Ahme, 2000] Whitmire, J. K. and Ahme, R. D. (2000). Costimulation in antiviral immunity : differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol*, 12(4) :448–55.
- [Wilson et al., 2001] Wilson, C., Palmer, B., Southwood, S., et al. (2001). Identification and antigenicity of broadly cross-reactive and conserved human immunodeficiency virus type 1-derived helper T-lymphocyte epitopes. *J Virol*, 75(9) :4195–207.
- [Wolfel et al., 1995] Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., et al. (1995). A p16INK4a-insensitive CDk4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, 269(5228) :1281–9.
- [Wu et al., 1999] Wu, J., Song, Y., Bakker, A., et al. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and dap10. *Science*, 285(5428) :730–2.
- [Wucherpfennig et al., 1994] Wucherpfennig, K. W., Sette, A., Southwood, S., et al. (1994). Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide to DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones. *J Exp Med*, 179(1) :279–90.
- [Wyss-Coray et al., 1992] Wyss-Coray, T., Brander, C., Frutiger, K., et al. (1992). Discrimination of human CD4 T cell clones based on their reactivity with antigen-presenting T cells. *Eur J Immunol*, 22(9) :2295–302.
- [Xiang et al., 2005] Xiang, R., Mizutani, N., Luo, Y., et al. (2005). A DNA vaccine targeting survivin combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication. *Cancer Res*, 65(2) :553–61.

- [Yamasaki et al., 1999] Yamasaki, K., Horiuchi, I., Minohara, M., et al. (1999). HLA-DPB1*0501-associated opticospinal multiple sclerosis : clinical, neuroimaging and immunogenetic studies. *Brain*, 122 :1689–96.
- [Yao et al., 2004] Yao, X., Hu, J. F., Li, T., et al. (2004). Epigenetic regulation of the taxol resistance-associated gene tRAG-3 in human tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 151 :1–13.
- [Yokoyama and Jacobs, 1989] Yokoyama, W. M. and Jacobs, L. B. (1989). A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type ii integral membrane proteins. *J Immunol*, 143(4) :1379–86.
- [Zaffaroni et al., 2005] Zaffaroni, N., Pennati, M., and Daidone, M. (2005). Survivin as a target for new anticancer interventions. *J. Cell. Mol. Med.*, 9(2) :360–372.
- [Zaks and Rosenberg, 1998] Zaks, T. Z. and Rosenberg, S. A. (1998). Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER- 2/neu+ tumors. *Cancer Res*, 58 :4902–10.
- [Zarour et al., 2000] Zarour, H. M., Kirkwood, J. M., Kierstead, L. S., et al. (2000). Melan-A/MART-1(51-73) represents an immunogenic HLA-DR4-restricted epitope recognized by melanoma-reactive CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(1) :400–5.
- [Zarour et al., 2002] Zarour, H. M., Maillere, B., Brusica, V., et al. (2002). NY-ESO-1 119-143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4+ T cells. *Cancer Res*, 62(1) :213–8.
- [Zeng et al., 2000] Zeng, G., Touloukian, C., Wang, X., et al. (2000). Identification of cd4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by hla-dr molecules. *Cancer Res*, 165 :1153–65.
- [Zeng et al., 2001] Zeng, G., Wang, X., Robbins, P. F., et al. (2001). CD4+ t cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA-DP4 allele : Association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(7) :3964–9.
- [Zhang et al., 2003] Zhang, Y., Chaux, P., Stroobant, V., et al. (2003). A MAGE-3 peptide presented by HLA-DR1 to CD4(+) T cells that were isolated from a melanoma patient vaccinated with a MAGE-3 protein. *J Immunol*, 171(1) :219–225.
- [Zhang et al., 2005a] Zhang, Y., Renkvist, N., Sun, Z., et al. (2005a). A polyclonal anti-vaccine CD4 T cell response detected withHLA-DP4 multimers in a melanoma patient vaccinated with MAGE-3.DP4-peptide-pulsed dendritic cells. *Eur J Immunol.*, 35(4) :1066–75.
- [Zhang et al., 2005b] Zhang, Y., Sun, Z., Nicolay, H., et al. (2005b). Monitoring of antivaccine CD4 T cell frequencies in melanoma patients vaccinated with a MAGE-3 protein. *J. Immunol.*, 174 :2404–11.
- [Zhao et al., 2005] Zhao, Y., Zheng, Z., Robbins, P., et al. (2005). Primary human lymphocytes transduced with ny-eso-1 antigen-specific tcr genes recognize and kill diverse human tumor cell lines. *J. Immunol.*, 174 :4415–23.
- [Zhu et al., 2003] Zhu, B., Chen, Z., Cheng, X., et al. (2003). Identification of HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from TRAG-3 antigen. *Clin Cancer Res.*, 9(45) :1850–7.

- [Zorn and Hercend, 1999] Zorn, E. and Hercend, T. (1999). A MAGE-6-encoded peptide is recognized by expanded lymphocytes infiltrating a spontaneously regressing human primary melanoma lesion. *Eur J Immunol.*, 29 :602–7.